

·基础研究·

运动训练对大鼠出血性脑损伤 BDNF 基因及其蛋白表达的影响

李红玲¹ 王马魁¹ 任力¹ 陈维¹ 李春岩²

摘要 目的:观察运动训练对脑出血(ICH)大鼠脑源性神经营养因子(BDNF)及其蛋白表达的影响。方法:实验动物用健康雄性 SD 大鼠 155 只。其中 120 只随机分为 3 组:实验组(出血后运动 n=40)、对照组(出血后不运动 n=40)、假手术组(无出血不运动 n=40 只)。各组又分为术后第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天共 4 个时相点,每个时相点 5 只用于免疫组化检测,5 只用于 RT-PCR 检测。实验组大鼠于术后第 72h 开始跑笼训练,其余大鼠在标准笼内自由活动。另外 35 只随机分为脑出血后第 6 小时、第 12 小时、第 24 小时、第 48 小时、第 72 小时,假手术和正常组,每组 5 只,用于免疫组化和 RT-PCR 检测。结果:①免疫组化结果:BDNF 阳性细胞表达为细胞浆着棕黄色,阳性细胞主要分布于血肿周围和大脑皮质的神经元。脑出血后第 12h BDNF 曾一度升高,第 72h 基本恢复正常。实验组随运动训练时间延长表达有上调趋势,第 28d 达高峰,较对照组相比有差异有显著性($P<0.05$),实验组和对照组与假手术组相比差异有显著性($P<0.05$)。②RT-PCR 结果:实验组与对照组和假手术组的 BDNFmRNA 表达(第 21—28d)相比差异有显著意义($P<0.05$),但对对照组与假手术组相比无显著性意义($P>0.05$)。结论:BDNF 参与了脑出血后神经可塑性的发生,运动训练可促进 BDNF 基因及其蛋白表达,从而改善神经功能。

关键词 运动训练;脑出血;脑源性神经营养因子;免疫组化;反转录-聚合酶链式反应;神经可塑性

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-09-0782-04

The effects of exercises on expressions of BDNF and BDNFmRNA after ICH in rats/LI Hongling, WANG Makui, REN Li, et al. //Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(9): 782—785

Abstract Objective: To investigate the effects of physical exercises on the expression of BDNF (brain-derived neurotrophic factor) and BDNFmRNA of neurons after ICH in rats. **Method:** A total 120 male SD rats (weight, 270 to 300g) were divided into three groups, trial group (ICH-induction and exercises group, n=40), control group (ICH-induction without exercises group, n=40) and sham-operation group (no operation, without ICH and exercises, n=40). The brains of rats were removed at the 7th d, 14th d, 21th d, 28th d after ICH respectively. The other 35 rats were divided into five groups for testing the BDNF changes at the 6th h, 12th h, 24th h, 48th h and 72nd h after ICH. The sham group and control group were randomly assigned at the same time (operated and normal). The activation of BDNF protein was measured with immunohistochemistry technology and BDNFmRNA was tested with RT-PCR. The rats in trial group started cage-running exercises at the 72th h after ICH. The others lived in standard cages. **Result:** ①BDNF-positive neurons appeared around hematoma and cerebral cortex. The number of BDNF-positive cells was very little in sham-operation group. There was an up-regulation of BDNF at the 12th h after ICH, then it returned to normal at the 72th h after ICH. The expression of BDNF had an up-regulation trend in trial group and control group, and there was a significant difference compared with sham operation group ($P<0.05$). But trial group had a higher level than control group ($P<0.05$). ②The result of RT-PCR for BDNF-mRNA: The trial group had a higher level than control group and sham operation groups, there was a significant difference at the 21st—28th d ($P<0.05$). The control group had a higher level than sham operation group, but there was no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion:** BDNF participate in neuron plasticity after ICH, and exercise training (cage-running) can clearly up-regulate the expressions of BDNF protein and BDNF-mRNA and improve neurological function.

Author's address Department of Rehabilitation, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Key words exercise; intracerebral hemorrhage; rats; brain-derived neurotrophic factor; immunohistochemistry; reverse transcription-polymerase chain reaction; neuron plasticity

脑的可塑性和功能重组是神经康复的主要机制。这些机制作用方式有许多种,如突触功能的调整、神经营养因子和神经生长因子的上调、神经干细胞移植,以及优良的环境和药物干预等。但这些相关研究主要是针对缺血性卒中中进行,有关运动对出血

性卒中(颅内出血 intracerebral hemorrhage, ICH)的

1 河北医科大学第二医院康复科,石家庄市,050000

2 通讯作者:李春岩(河北医大二院神经内科)

作者简介:李红玲,女,主任医师,博士,硕士研究生导师

收稿日期:2008-3-12

作用及其作用机制, 国内外尚未进行深入研究。因此, 本研究目的旨在观察运动训练对脑出血大鼠脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及其蛋白表达的影响, 从而探讨运动训练对出血性脑损伤后大脑可塑性的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器: 电泳仪 (DYY-12)、电泳槽 (DYCZ-40B)和水浴式电转膜系统(北京六一仪器厂);超低温冰箱(日本 SANYO 公司);5417R 低温高速离心机、5415D 台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司)和 Mastercycler384DNA 扩增仪 (德国 Eppendorf 公司);756 型紫外分光光度计 (上海);GeneAmp 9600 型 PCR 仪 (美国 PE 公司);UVP 凝胶扫描系统 (美国 UVP 公司);微量移液器 (德国 Gilson)。

1.1.2 主要试剂:封闭用正常山羊血清、生物素标记羊抗兔 IgG、辣根酶标记链霉卵白素(S-A/HRP)、DAB 显色剂和 APES (北京中山生物技术有限公司);异丙醇(北京益利精细化学品有限公司);甘油(丙三醇,北京华美公司);EDTA (美国 Promega 公司);BDNF 多克隆抗体 (北京中山生物技术有限公司);丽春红 S、十二烷基硫酸钠和 β -巯基乙醇(美国 Amresco 公司);三羟甲基胺基甲烷(Tris,上海化学试剂有限公司);Red TaqDNA 聚合酶 (北京赛百盛公司);RT-PCR 引物 (上海生物工程公司合成);逆转录酶 (AMV-RT)、核糖核酸酶抑制剂 (RNasin)、dNTP、Taq DNA 聚合酶、随机引物 (Random primers)和琼脂糖(美国 Promega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物与分组: 实验动物用健康雄性 SD 大鼠 155 只,体重 270—300g,由河北医科大学基础医学院实验动物中心提供,清洁级,以标准饲料和纯净水喂养,饲养环境为我院动物室多层层流架,恒温(20—25℃)。随机分为 3 组,实验组(出血后运动, n=40)、对照组(出血后不运动, n=40)、假手术组(无出血不运动, n=40 只)。实验组和对照组又分为术后第 7, 14, 21, 28 天共 4 个时相点,每个时相点 5 只用于免疫组化检测,另 5 只用于 RT-PCR 检测。试验组于术后第 72h 开始跑笼训练 (具体方法详见参考文献 1),其余大鼠在标准笼内自由活动。在分组前另外取 35 只大鼠(ICH 后第 6, 12, 24, 48, 72h,假手术和正常大鼠各 5 只)用于免疫组化和 RT-PCR 检测。

1.2.2 动物模型建立: 参照李红玲等所用方法^[1],实

验组和对照组采用细菌胶原酶 0.5U (工作浓度为 0.2U 胶原酶/ μ l 生理盐水) 诱导大鼠右侧尾状核脑出血模型(出血量均匀一致,直径约 2.5—3.0mm,但未进行准确测量)。假手术组操作方法同实验组,但不注射胶原酶,只注射同等剂量的生理盐水。

1.2.3 免疫组化标本采集: 于相应时间点将动物用速眠新注射液(0.2ml/mg)麻醉后,迅速开胸,经心脏至主动脉插管,先用生理盐水约 100ml 冲洗血液,然后以多聚甲醛约 400ml 先快后慢进行灌流固定 1.5—2h。迅速解剖切取出大脑,去除额极 4mm 前部脑组织,经脑表面穿刺点冠状切开标本,取穿刺点后约 4mm 的脑组织,放入 4%多聚甲醛液固定,经脱水、透明、石蜡包埋,免疫组化备用。

1.2.4 BDNF 检测: BDNF 蛋白检测采用免疫组化 SP 法。具体步骤按试剂盒说明书进行, BDNF 多克隆抗体,工作浓度 1:50。BDNF 蛋白以细胞胞浆呈棕黄色着色为阳性细胞。随机选择 5 个视野,然后算出每高倍(400 \times)镜下阳性细胞数。

1.2.5 RT-PCR 取材: 试验者严格操作,戴口罩、帽子、手套,由专人负责断头处死大鼠,专人使用 200℃干烤的器械于手术台上留取右侧血肿周围(7d 内可见明显血肿,取材方便,7d 后取材参照前述部位)大脑组织 100mg \times 2,迅速将组织置于 4℃ DEPC 水中洗去血液后,放入消毒冻存的 EP 管内,投入液氮壶中,然后放入-80℃冰箱保存备用。

1.2.6 RT-PCR 测定 BDNF mRNA 表达水平: 用 Trizol RNA 提取试剂提取细胞总 RNA,紫外线分光光度计测定总 RNA 的浓度和纯度,用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 的质量。cDNA 第一链合成后 37℃反转录 60min, 95℃ 5min 灭活反转录酶。反转录后 cDNA 作为 PCR 模板,扩增。上游引物 5'cac tcc gac ccc gcc cgc cg -3'下游引物: 5' tcc act atc ttc ccc ttt ta-3, R-BDNF 基因扩增条件为: 94℃ 5min, 然后 94℃ 45s, 56℃ 40s, 72℃ 45s(35 个循环), 72℃ 延伸 5min。扩增目的片段长度为 364bp。同时扩增鼠 β -actin 用作内参照, 保证每次实验的相对可比性, 扩增的目的片段长度为 374bp。然后取 RT-PCR 产物 4 μ l, 加上样缓冲液 1 μ l, 在 1.5%琼脂糖凝胶(含 EB)上电泳, 80V, 45min, 用 UVP 凝胶图像成像系统拍摄打印实验结果, 用凝胶图像分析系统(Gel-Pro Analyzer Version 3.0)分析结果。

1.3 统计学分析

应用 State 8.0 软件进行分析。数据以均数 \pm 标准差表示, 各组均数的比较行单因素方差分析, 进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 BDNF 免疫组化结果

BDNF 阳性细胞表达为细胞胞浆着棕黄色,着色部位主要见于血肿周围和大脑皮质的神经元。正常大鼠脑组织表达很低,脑出血后 12h 一度上调,与正常组和假手术组相比有显著性($P<0.05$),之后逐渐下降,第 3 天后接近正常(见图 1—2,表 1)。实验组和对照组随时间延长出现 BDNF 表达上调趋势,以第 21 天和第 28 天表达明显。但实验组表达更显著,两组间差异有显著性($P<0.05$),两组与假手术组相比差异同样有显著性($P<0.05$)(见图 3,表 2)。

2.2 BDNFmRNA 结果

在 365bp 处和 375bp 处分别为 BDNF 和 β -actin 的扩增带。取 BDNF 与 β -actin 的比值为基因表达量。结果显示与免疫组化结果相近,实验组和对照组的 BDNFmRNA 表达与假手术组相比差异有显著性($P<0.05$)。但对照组与假手术组相比虽有上调表达的倾向但无显著性($P>0.05$)(见图 5,表 3)。



图 1 正常大鼠脑组织(200 \times) 图 2 血肿周围组织 BDNF 阳性细胞表达 (ICH12h,400 \times)

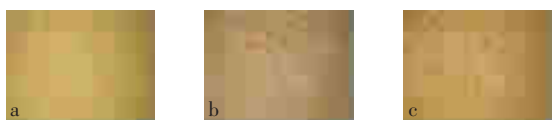


图 3 假手术组(a)对照组(b)和实验组(c)大鼠脑组织 BDNF 阳性蛋白表达 (ICH后 21d \times 400)

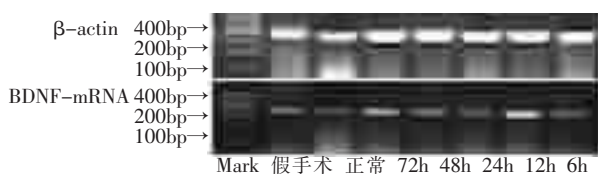


图 4 不同时间点 β -actin 和 BDNF-mRNA 表达

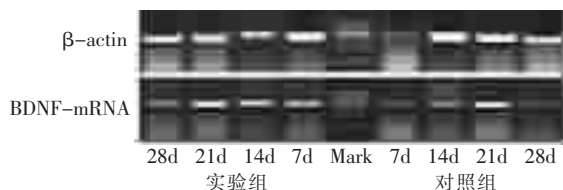


图 5 实验组和对照组不同时间点 β -actin 和 BDNF-mRNA 表达

表 1 不同时间点脑组织 BDNF 阳性细胞的表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	第 6 小时	第 12 小时	第 24 小时	第 48 小时	第 72 小时
出血组	25	9.6 \pm 2.12	17.3 \pm 5.01 ^{①②}	9.68 \pm 4.33	7.34 \pm 3.62	7.96 \pm 3.17
假手术组	5	7.12 \pm 2.47				
正常组	5	6.3 \pm 3.06				

与假手术组比:① $P<0.05$,与正常组比:② $P<0.05$

表 2 不同时间点脑组织 BDNF 阳性细胞的表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
实验组	20	16.25 \pm 2.5	16.75 \pm 2.99	21.25 \pm 5.68 ^{①③}	29.12 \pm 3.30 ^{①③}
对照组	20	11.5 \pm 3.11	9.25 \pm 4.79	14.25 \pm 6.08 ^②	17.9 \pm 3.82 ^②
假手术组	20	8.5 \pm 2.08	7.0 \pm 4.76	6.75 \pm 3.5 ^①	6.4 \pm 4.03 ^①

与对照组比:① $P<0.05$;与假手术组比:② $P<0.05$,③ $P<0.01$

表 3 不同时间点血肿周围脑组织 BDNF mRNA 的表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	第 6 小时	第 12 小时	第 24 小时	第 48 小时	第 72 小时
出血组	25	0.63 \pm 0.12	0.80 \pm 0.29 ^②	0.68 \pm 0.33	0.64 \pm 0.32	0.76 \pm 0.17
假手术组	5	0.64 \pm 0.08				
正常组	5	0.58 \pm 0.18				

与假手术组比:① $P<0.05$,与正常组比:② $P<0.05$

表 4 不同时间点血肿周围脑组织 BDNF mRNA 的表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
实验组	20	0.42 \pm 0.05	0.66 \pm 0.07	0.84 \pm 0.12 ^{①②}	0.82 \pm 0.14 ^{①②}
对照组	20	0.54 \pm 0.22	0.48 \pm 0.03	0.59 \pm 0.02	0.49 \pm 0.06
假手术组	20	0.46 \pm 0.08	0.46 \pm 0.08	0.46 \pm 0.08	0.46 \pm 0.08

与对照组比:① $P<0.05$;与假手术组比:② $P<0.05$

3 讨论

BDNF 是营养素家族成员之一^[2],广泛分布于中枢神经系统和感觉神经及脊髓运动神经元。自 1989 年被克隆以来,BDNF 的生物学作用受到国内外广泛的研究。BDNF 在胚胎发育期对神经系统的发育、分化、成熟、突触的形成不可缺少,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^[3]。成熟的神经元对刺激具有调节其结构及功能的能力,称为可塑性。神经营养因子可作为这种结构功能可塑性的分子媒介。BDNF 可通过改变胆碱能神经元的功能,改变神经元的活性,进而调节皮质的可塑性^[4]。

脑组织在受到损伤后,如缺血、缺氧、损伤、癫痫、中毒等,均可见到 BDNF 及其他神经营养因子在脑中表达增多。Yang^[5]发现短暂全脑缺血后第 2h—7d,用原位杂交的方法发现海马区的 BDNFmRNA 及蛋白均有升高,其中第 6h 是假手术组的 4.07 倍,第 2d 是假手术组的 2.84 倍。微栓塞后第 7d,在海马、皮质的缺血半暗带区也可见 BDNF 的表达升高^[6]。研究认为^[7-8],脑缺血缺氧损伤后,BDNF 及其受体 TrkB 基因表达增加,尤其以脑梗死灶周围和海马区更突出。但关于脑出血后 BDNF 蛋白合成及分布规律鲜见报道。武衡^[9]研究显示,在脑出血后第 2h 即开始出现 BDNF 及 BDNFmRNA 的表达,第 6h 表达开始升高,第 1d 到高峰,以后逐渐降低,到第 7 天模型组仍可见少量表达,此现象可维持到第 14 天。本研究结果也有类似表现,BDNF 表达在 ICH 后第 12h 曾有一短暂上调高峰,之后下降,第 72h 后基本接近正常。ICH 后第 21 天和第 28 天出血对照组 BDNF 表达仍与假手术组有明显差异,但

BDNF mRNA 虽较假手术组比有升高趋势, 但无显著性, 这可能与样本量较小有关。这些结果提示脑出血损伤本身可通过促进血肿周围神经细胞自分泌或旁分泌 BDNF 方式作用于自身或邻近的神经元, 通过维持细胞内钙离子稳定、清除自由基、阻滞细胞凋亡、拮抗兴奋性氨基酸毒性、修复受损的神经元、促进神经元再生、刺激轴突的芽生和新突触的形成, 以实现其保护神经元免受缺血缺氧的损伤, 故内源性 BDNF 是抵御缺血缺氧脑损伤的内在保护剂^[2,10]。

但研究证明, 脑损伤后自然的 BDNF 表达上调过程很短暂, 呈阶段性增高, 且其上调幅度有限, 自我保护时间和程度是有限的。另外, BDNF 作为一种大分子蛋白质在正常条件下很难通过血脑屏障^[9,11], 虽然脑缺血和或缺血再灌注损伤可以破坏血脑屏障, 使 BDNF 得以通过, 但由于 BDNF 可快速降解^[12], 治疗应用时需重复用药, 加上药源匮乏, 脑内给药又会造成新的损伤, 且操作复杂等问题, 使得外源性 BDNF 的应用难以有效开展。

目前, 对 ICH 尚缺乏有效的治疗手段, 即使及时清除血肿也难以取得满意的疗效。以往大量研究证实运动训练对脑梗死大鼠的功能预后有明显改善^[13-14], 但运动训练对脑出血实验动物神经功能影响方面的研究较少, 国外仅有个别报道^[15-17], 国内李红玲^[1]报道运动可以促进 ICH 大鼠的功能恢复。但有关作用机制方面的研究很少。最近, Y Ding^[18]应用短暂大脑中动脉缺血模型研究显示, 运动能增加脑内 NGF、BDNF 的表达, 同时减小梗死体积, 说明梗死体积的减小可能与内源性 NGF、BDNF 的表达增多有关。Ploughman 等^[19]研究说明, 耐力训练可以促进脑卒中后肢体屈伸活动的学习能力, 为脑卒中患者提供更理想的治疗方法。且适度的运动可以促进脑区与突触可塑性有关的蛋白表达, 改善脑卒中后运动学习能力, 对脑卒中患者更安全, 对 BDNF 产生的作用延迟且持久, 从而更好的促进神经重塑^[20]。

本研究虽然是针对脑出血动物, 但结果同样显示, 运动训练可以使 BDNF 蛋白及其基因表达上调, 而且持续时间较长, 与上述结果相近。

4 结论

BDNF 参与 ICH 后神经可塑性的发生, 而运动训练可促进 BDNF 蛋白及其基因表达, 从而改善神经功能。运动训练促进 BDNF 上调的机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 李红玲, 刘春辉, 葛艳萍, 等. 运动训练对脑出血大鼠神经功能恢复的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28 (10): 649—652.
- [2] 李玲综述. 脑源性营养因子与脑缺血缺氧的研究进展 [J]. 国外医学. 儿科学分册, 2001, 28 (3): 155—158.
- [3] Arimatsu Y, Miyamoto M. Survival-promoting effect of NGF on in vitro septohippocampal with cholinergic and GABA ergic phenotypes [J]. Brain Res Dev Brain Res, 1991, 58 (2): 189—201.
- [4] How DL, Mobley WC. Nerve growth factor effects on cholinergic modulation of hippocampal and cortical plasticity [J]. Neurobiology of the Neurotrophins, 2001, 255—370.
- [5] Yang JT, Chang CN, Lee TH, et al. Effect of dexamethasone on the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 messenger ribonucleic acids after forebrain ischemia in the rat [J]. Crit Care Med, 2002, 30 (4): 913—918.
- [6] Miyake K, Yamamoto W, Tadokoro M, et al. Alterations in hippocampal GAP-43, BDNF and L1 following sustained cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2002, 935 (1): 24—31.
- [7] Lee TH, Yang JT, Kato H, et al. Expression of brain derived neurotrophic factor immunoreactivity and mRNA in the hippocampal CA1 and cortical areas after chronic ischemia in rats [J]. J Neurosci Res, 2004, 76: 705—712.
- [8] Hagihara H, Hara M, Tsunekawa K, et al. Tonic-clonic seizures induce division of neuronal progenitor cells with concomitant changes in expression of neurotrophic factors in the brain of pilocarpine-treated mice [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 139: 258—266.
- [9] 武衡. 脑出血大鼠脑内脑源性神经营养因子蛋白及 mRNA 表达变化与意义 [J]. 中华老年心脑血管杂志, 2006, 8 (8): 564—567.
- [10] Schulz SW, Fegbeutel C, et al. Changes in extracranial arteries in obstructive sleep apnoea [J]. Eur Respir J, 2005, 25 (1): 69—74.
- [11] Zhang Y, Pardridge WM. Neuroprotection in transient focal brain ischemia after delayed intravenous administration of brain-derived neurotrophic factor conjugated to a blood-brain barrier drug targeting system [J]. Stroke, 2001, 32: 1378—1384.
- [12] Kokaia Z, Andberg G, Yan Q, et al. Rapid alterations of BDNF protein levels in the rat brain after focal ischemia: evidence for increased synthesis and anterograde axonal transport [J]. Exp Neurol, 1998, 154: 289—301.
- [13] 徐莉, 李玲, 陈景藻, 等. 康复训练对大鼠脑梗塞神经功能恢复的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22: 86—88.
- [14] 高谦, 吴宗耀, 姚志彬, 等. 运动训练促进小鼠脑局灶缺血后功能恢复 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22: 273—275.
- [15] Debow SB, Davies ML, Clarke HL, et al. Constraint-induced movement therapy and rehabilitation exercise lessen deficits and volume of brain injury after striatal hemorrhage stroke in rats [J]. Stroke, 2003, 34: 1021—1026.
- [16] Lee HH, Kim H, Lee MH, et al. Treadmill exercise decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death via suppression on caspase-3 expression in rats [J]. Neurosci Lett, 2003, 352: 33—36.
- [17] Lee HH, Shin MS, Kim YS, et al. early treadmill exercise decreases hemorrhage-induced neuronal cell death and increases cell proliferation in the dentate gyrus of streptozotocin-induced hyperglycemic rats [J]. J Diabetes Complications, 2005, 19 (6): 339—346.
- [18] Ding Y, Li J, Luan X, et al. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin [J]. Neuroscience, 2004, 124: 583—591.
- [19] Ploughman M, Attwood Z, White N, et al. Endurance exercise facilitates relearning of forelimb motor skill after focal ischemia [J]. Eur J Neurosci, 2007 Jun, 25 (11): 3453—3460.
- [20] Ploughman M, Granter-Button S, Chernenko G, et al. Exercise intensity influences the temporal profile of growth factors involved in neuronal plasticity following focal ischemia [J]. Brain Res, 2007, 30 (1150): 207—216.