

成年斑马鱼脊髓损伤修复中 BDNF/TrkB 的表达研究

赵厚德, 崔春, 刘春杰, 胡程铭, 申延琴*

(江南大学医学院神经科学中心, 江苏 无锡 214122)

摘要:目的 斑马鱼具有很强的脊髓损伤后的修复能力,如在脊髓完全横断的4~6周内即可恢复自由游泳能力,但是目前修复机制不明。本文旨在研究斑马鱼脊髓损伤修复过程中,脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和其受体酪氨酸激酶受体B(Tropomyosin-related kinase receptor subtype B, TrkB)的作用。方法 本文通过建立成年斑马鱼脊髓损伤模型,采用实时定量PCR方法,检测了脊髓损伤不同时间点斑马鱼脊髓中BDNF和TrkB基因的表达情况;进而用蛋白质电泳方法检测了脊髓损伤急性期和慢性恢复期斑马鱼脊髓中BDNF蛋白质的表达情况。结果 同假手术组相比,脊髓损伤组斑马鱼脊髓组织BDNF和TrkB基因在损伤急性期(4h)和修复早期(6d)呈现显著性升高($P < 0.05$),同时,脊髓BDNF蛋白的表达在损伤急性期(24h)显著性降低($P < 0.05$),在神经修复期(15d)显著性升高($P < 0.05$)。结论 斑马鱼脊髓损伤后修复期局部存在着良好的神经再生微环境,从而可能促进轴突的再生长及运动能力的恢复。

关键词: 脊髓损伤;神经修复;斑马鱼;BDNF;TrkB

中图分类号:R651.2 文献标识码:A 文章编号:1672-2639(2016)01-0001-05

Expression of BDNF/Trkb in injury and recovery of adult zebrafish spinal cord

ZHAO Hou-de, CUI Chun, LIU Chun-jie, HU Cheng-ming, SHEN Yan-qin*

(Center for Neuroscience, Jiangnan University Medical College, Wuxi, 214122, China)

Abstract: Objective Zebrafish demonstrates strong recovery ability for spinal cord injury. For example, zebrafish could recover their swimming ability from spinal cord complete transection in 4 to 6 weeks. However, the recover mechanism is still kept unclear. **Methods** In order to investigate the function of Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tropomyosin-related kinase receptor subtype B (TrkB) during the spinal cord regeneration, spinal cord injury models was built in adult zebrafish. Real-time quantitative PCR was used to detect the changes of BDNF and TrkB mRNA expression in the spinal cord of injured zebrafish at different timepoints post-SCI. Then, Western Blot was used to detect the changes of BDNF in the acute phase and chronic phase of neuroregeneration. **Results** The results showed that, compared with the sham group, the mRNA levels of BDNF and TrkB in zebrafish spinal cord were up-regulated in the acute phase (4 hours post-SCI) and early phase of neuroregeneration (6 days post-SCI) significantly ($P < 0.05$). The level of BDNF protein in spinal cord lower than the sham group during the acute phase (24 hours post-SCI) significantly ($P < 0.05$), and then increased in the chronic phase of neuroregeneration (15 days post-SCI) significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** These results suggested that a more beneficial microenvironment in zebrafish spinal cord possibly results in axonal regeneration and swimming recovery after SCI.

Key words: Spinal cord injury; Zebrafish; Neural regeneration; BDNF; TrkB

基金项目:江苏省自然科学基金(NO:BK20151127)及国家自然科学基金(NO:82541123)

作者简介:赵厚德(1990—),男,安徽合肥人,神经生物学硕士研究生,从事脊髓损伤研究。

* 通讯作者:申延琴(1971—),女,陕西延安人,神经生物学博士,教授,从事帕金森病和脊髓损伤研究。

脊髓损伤(Spinal Cord Injury, SCI)是一类目前为止尚无有效治疗方法的高致残性神经系统疾病。与哺乳动物不同,斑马鱼在脊髓损伤后具有很强的自主修复能力,成年斑马鱼在脊髓损伤后六周即可基本恢复其正常运动水平^[1]。推测斑马鱼的这一特殊性能是由多种因素造成的,其中损伤过程中的微环境对修复的影响作用不容忽视^[2]。损伤后所诱导的一些细胞因子如神经营养因子和氧化应激因子等会对损伤后神经元存活轴突生长发挥重要作用^[3-6]。神经营养因子如脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)在斑马鱼幼鱼发育过程中促进中枢神经系统和外周神经系统的发育,在成鱼神经系统中保护神经元^[7]。Trk 属于受体酪氨酸激酶,是原癌基因编码的神经营养因子受体家族的成员之一,其家族成员的胞内区有高度同源性,目前已知该家族编码的神经营养因子受体有 TrkA, TrkB, TrkC 三种亚型^[8]。TrkB 是 BDNF 的受体,在小鼠颈部脊髓损伤后,通过提高 TrkB 和 BDNF 在运动神经元中的表达水平,可以有效提高膈肌活动恢复速度,进而提高呼吸功能^[9-10]。大量的研究表明 BDNF/TrkB 信号通路对神经系统的生长和损伤后恢复具有重要作用^[11-14]。因此组织环境中 BDNF/TrkB 的升高有可能促进脊髓损伤后神经的修复。但是斑马鱼脊髓损伤后的 BDNF/TrkB 是否与其在哺乳类动物中的作用相似,值得探讨。

本文利用成年斑马鱼脊髓损伤模型,研究其损伤后不同时间点损伤位点下游脊髓组织中 BDNF 和 TrkB 基因相对于内参 gapdh 基因的表达变化。探讨了 BDNF/TrkB 对脊髓损伤修复过程的影响。结果显示,成年斑马鱼脊髓损伤修复过程中脑内 BDNF 和 TrkB 基因的变化呈现升高的动态过程,提示了在脊髓修复过程中,脊髓组织中的神经营养因子变化可能对脊髓损伤位点组织的再生与修复产生影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

本实验中所使用动物为 6 月龄成年斑马鱼,购自上海佳誉水族馆,体长 2~3 cm。所涉及的所有斑马鱼实验都经过江南大学无锡医学院实验动物管理委员会审核通过,符合实验动物的伦理学要求。手术前斑马鱼集中养殖于 28℃ 温室,每天给予 14 h 光照和 10 h 无光照。将成年斑马鱼随机分为假手术组和脊髓损伤组。实时定量 PCR 实验中,脊髓损

伤组和假手术组分别于脊髓损伤术后或假手术后 4 h、12 h、6 d 取损伤点下游 5 mm 组织存于 -80℃ 保存备用(每个时间点设置 8 个样本)。

1.2 脊髓损伤动物模型制备

参照 Schachner 研究小组的方法制作成年斑马鱼脊髓损伤模型^[1,15]。术前使用 0.033% 3-氨基苯甲酸乙酯甲基磺酸盐(MS222, Sigma-Aldrich)麻醉 30 s。以鳃盖后缘和背鳍连线间的中点为起点,沿皮肤做纵切口(约 2 mm)暴露脊髓。手术组用精密剪刀切断脊髓;假手术组暴露但并不切断脊髓。闭合伤口后,用组织粘合剂封闭伤口。SCI 手术成功标志:手术时在显微镜下能够看到脊髓完全横断的截面,并且术后 3 d 斑马鱼无游泳能力。SCI 修复标志:斑马鱼于术后 7 d,具有较弱的游泳能力,同时体型保持直线型,无 C 型或 S 型等畸形。

1.3 实时定量 PCR

1.3.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 从损伤后成年斑马鱼全脑组织中提取基因组 RNA(EZgene Tissue RNA Miniprep Kit, BIOMIGA, San Diego), -80℃ 冰箱储存备用。将提取的脑组织中总 RNA 用反转录试剂盒(PrimeScript RT Master Mix, Takara, Dalian)反转录合成 cDNA。

1.3.2 引物设计 根据 NCBI 上 BDNF 的 mRNA 序列并结合斑马鱼全基因组测序公布的序列(BDNF 基因登录号:NM_001308649.1, TrkB 基因登录号:NM_001197161.2, GAPDH 基因登录号:NM_001151114.1),利用 Primer premier 5.0 设计引物。引物序列如表 1 所示。

表 1 斑马鱼 BDNF 和 TrkB 基因 PCR 所用引物

目的基因 (℃)	引物	序列(5'→3')	产物长 度(bp)	复性 温度
BDNF	F	5'-AACATTCCGTTTACATTCTC-3'	100	60
	R	5'-ACAACAGCACCTTGACATAG-3'		
TrkB	F	5'-GGAAAAGCAAAAACCCCTGTCTAGA-3'	104	60
	R	5'-TGTAGCATCACTTCTGCCATT-3'		
GAPDH	F	5'-GTGTAGCGCTGGACTGTGGT-3'	121	60
	R	5'-TGGGAGTCAACCAGGACAATA-3'		

1.3.3 PCR 扩增体系和条件 实时荧光定量 PCR 技术对斑马鱼脊髓损伤后不同时间点 mRNA 表达量进行相对定量分析。荧光染料为 SYBR GreenI (SYBR® Green Real-time PCR Master Mix, Taka-

ra, Dalian), 以 GAPDH 作为内参, 实时定量 PCR 反应体系总体积为 10 μL , 包括: SYBR 5 μL , Primer Mix 0.4 μL , Rox 0.2 μL , DEPC H₂O 3.4 μL , 上、下游引物 (F、R) (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.2 μL , 模板 (25 ng/ μL) 1 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 复性 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 39 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。由 Roche Light Cycler[®] 480II 型荧光定量 PCR 仪收集荧光信号。每个待测样品 cDNA 设置 3 个重复, 对得到的 3 个 Cp 值取平均值, 用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 法进行计算。

1.4 蛋白质印迹

1.4.1 脊髓总蛋白提取及样品制备 将损伤后成年斑马鱼脊髓组织加裂解液 RIPA 与蛋白酶抑制剂 PMSF 裂解 (碧云天生物技术研究), 室温 12000g 离心 15 min, 取上清液, 得到总蛋白。用酶标仪测定蛋白浓度后加蛋白上样缓冲液 (北京索莱宝生物科技有限公司), 煮沸 10 min, 放 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存备用。

1.4.2 免疫印迹 取等量蛋白上样于 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS - PAGE), 通过电泳槽电泳 (Bio - Rad), 并采用预染蛋白 marker (Thermo Scientific, USA) 作对照。电泳起始电压调整为 80 V, 待溴酚蓝由浓缩胶进入分离胶后将电泳仪电压调 100V, 当溴酚蓝抵达分离胶底部时终止电泳。待电泳结束后, 通过湿式转移电泳仪把凝胶泳道中总蛋白转移到 PVDF 膜上。成功转膜后, 根据彩虹预染蛋白质 Marker 的大小将膜剪为两部分, 使内参蛋白与目的蛋白条带分开并分别标记, 然后把膜置于 5% 脱脂奶粉的封闭液中室温封闭 1 小时, 用 TBST 洗膜 5 s, 然后把内参蛋白膜和目的蛋白膜分别置 5% BSA 稀释的 β - tubulin 一抗 (1:2000) (碧云天生物技术研究) 溶液和 5% BSA 稀释的 BDNF 一抗 (1:800) (R&D Systems 公司) 溶液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。再次用 TBST 洗膜 510 min, 然后内参蛋白膜和目的蛋白膜分别放入 5% BSA 稀释的辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG, (1:2000) 溶液、5% BSA 稀释的山羊抗小鼠二抗 (辣根酶标记, 1:2000) 溶液中, 室温孵育 1.5 小时, 然后用 TBST 洗膜 510 min, 用 ECL 试剂盒 (碧云天生物技术研究) 显影, 置于凝胶成像仪中 (Bio - Rad) 照相并应用 IamgeJ 软件对 BDNF 及 β - tublin 蛋白质条带灰度进行定量分析处理。

1.5 数据分析

实时荧光定量 PCR 数据结果通过独立样本 T - Test 分析, 比较各个时间点手术组与假手术组的 mRNA

表达水平。蛋白质电泳数据使用单因素方差分析, 比较各个时间点手术组与假手术组的蛋白质表达水平, 根据统计学定义选取 $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 BDNF mRNA 在脊髓损伤修复过程中表达量的变化

实验证明, 与对应时间点的假手术组相比, 手术后 4 h, BDNF mRNA 在斑马鱼脊髓中极显著升高 ($P < 0.01$), 在脊髓中的表达量大约是假手术组的 2.8 倍; 手术后 6 d, BDNF 基因在斑马鱼脑中的表达量显著升高 ($P < 0.05$), 在脊髓中的表达量大约是假手术组的 3.2 倍 (图 1)。

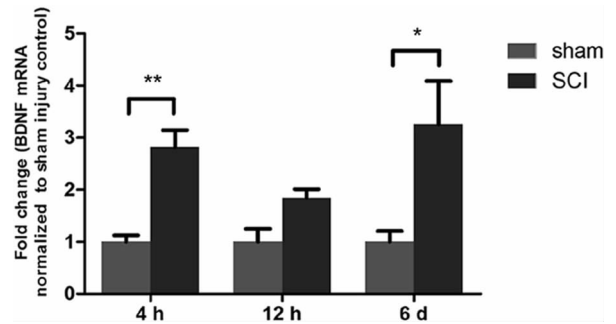


图 1 脊髓中 BDNF 基因在斑马鱼脊髓损伤后不同时间点的表达变化

2.2 斑马鱼脊髓损伤修复过程中, 脊髓中 BDNF 蛋白的表达变化

实验证明, 与假手术组相比, 在脊髓损伤后 24 h, BDNF 蛋白表达量显著降低约 22% ($P < 0.05$); 到损伤后 15 d 时, BDNF 蛋白表达量显著升高约 30%。

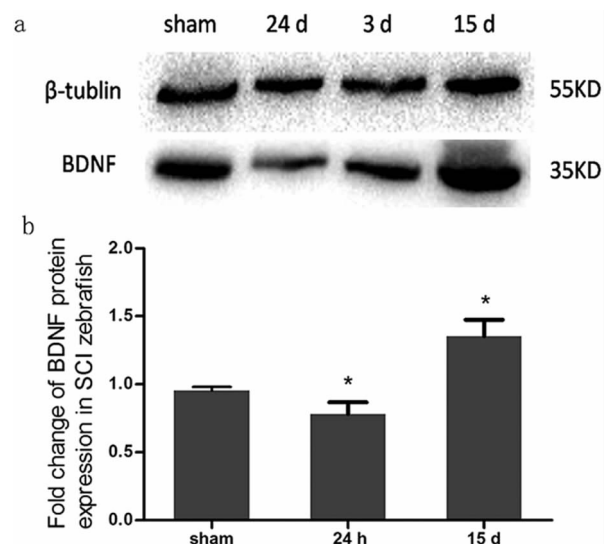


图 2 脊髓中 BDNF 蛋白在斑马鱼脊髓损伤后不同时间点的表达变化

2.3 TrkB mRNA 在脊髓损伤修复过程中表达量的变化

实验证明,与对应时间点的假手术组相比,手术后 4 h,TrkB mRNA 在斑马鱼脊髓中极显著升高($P < 0.05$),在脊髓中的表达量大约是假手术组的 1.7 倍;手术后 6 d,TrkB 基因在斑马鱼脑中的表达量显著升高($P < 0.05$),在脊髓中的表达量大约是假手术组的 2.3 倍。(图 3)。

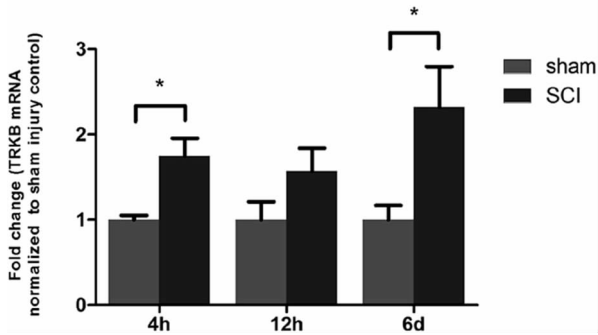


图 3 脊髓中 TrkB 基因在斑马鱼脊髓损伤后不同时间点的表达变化

3 讨论

本课题组前期研究结果已经证实,成年斑马鱼脊髓损伤后,特定的基因表达会迅速做出相应改变,当基因水平的变化积累到一定程度就可以引起相应蛋白的变化,至损伤后 18 天,神经轴突自主修复可达到 50%,其游泳行为的恢复也在损伤后 2~3 周显现^[1]。因此,本研究选取脊髓损伤后 4 h,12 h,24 h 时间点作为损伤修复的急性期,选取 6 d,15 d 作为损伤修复的初期^[16]。分别在这两个时期中选取样本检测成年斑马鱼脊髓损伤后脊髓中 BDNF 和 TrkB 的表达变化,探讨这两个基因的表达变化对于斑马鱼脊髓损伤修复的影响。

神经营养因子(neurotrophin,NT)是一类对神经元的发育、成熟、存活有重要作用的蛋白。神经损伤后,神经元或胶质细胞可分泌多种神经营养因子,通过自分泌、旁分泌等方式与相应的神经细胞上特异性受体结合,激发多种信号通路而发挥其支持神经元生长、发育和神经损伤修复的作用^[17]。斑马鱼脊髓损伤后的再生修复主要依靠的也是运动神经元的再生^[18]。本文检测了斑马鱼脊髓损伤后 TrkB 和 BDNF 的 mRNA 表达水平,以及 BDNF 的蛋白表达水平。结果显示,在急性期 4 h,BDNF 和 TrkB 的 mRNA 水平在脊髓损伤的成年斑马鱼脊髓下段都显著升高,并且变化水平相似,损伤后 12 h,BDNF 和

TrkB 的 mRNA 水平开始下降。与之相对应的是 BDNF 蛋白水平在 24 h 显著下降,这提示可能是神经元在损伤急性期内受到重创的原因,但是在神经修复初期 6 d,BDNF 和 TrkB 的 mRNA 水平显著升高,而 BDNF 的蛋白质水平也在修复期的 15 d 检测到显著增高。这说明修复期的 BDNF 和 TrkB 表达增加很可能为损伤区域提供了一个友好的微环境,促进了斑马鱼脊髓损伤的修复。对此有支持证据的是,发育和损伤往往会分享某些分子机制,而已有研究表明,在斑马鱼发育过程中,BDNF/TrkB 信号通路控制着神经元的存活和凋亡^[12]。总之,本研究表明,BDNF/TrkB 表达增加对于斑马鱼脊髓损伤后的修复具有一定的促进作用,与其在哺乳类动物中的神经保护作用具有相似性^[11,19]。即:成年斑马鱼脊髓损伤修复过程中,脊髓中高表达的 BDNF/TrkB 水平可能促进受损的运动神经元轴突再生,进而恢复运动能力。但是确切的作用机制有待于进一步的实验如利用 morpholino 技术或者转基因斑马鱼技术来回答。

参考文献:

- [1] Fang P, Lin JF, Pan HC, et al. A surgery protocol for adult zebrafish spinal cord injury [J]. *Journal of genetics and genomics*, 2012, 39(9): 481-487.
- [2] Kizil C, Kaslin J, Kroehne V, et al. Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish [J]. *Developmental neurobiology*, 2012, 72(3): 429-461.
- [3] Ma L, Yu YM, Guo Y, et al. Cysteine- and glycine-rich protein 1a is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish [J]. *The European journal of neuroscience*, 2012, 35(3): 353-365.
- [4] Mocchetti I, Wrathall JR. Neurotrophic factors in central nervous system trauma [J]. *Journal of neurotrauma*, 1995, 12(5): 853-870.
- [5] Reid AJ, Sun M, Wiberg M, et al. Nerve repair with adipose-derived stem cells protects dorsal root ganglia neurons from apoptosis [J]. *Neuroscience*, 2011, 199(0): 515-522.
- [6] Chu TH, Wang L, Guo A, et al. GDNF-treated acellular nerve graft promotes motoneuron axon regeneration after implantation into cervical root avulsed spinal cord [J]. *Neuropathology and applied neurobiology*, 2012, 38(7): 681-695.
- [7] Farinas I. Neurotrophin actions during the development of the peripheral nervous system [J]. *Microscopy research and technique*, 1999, 45(4-5): 233-242.

- [8] Wang H, Teh MT, Ji Y, et al. EPS8 upregulates FOXM1 expression, enhancing cell growth and motility [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(6): 1132–41.
- [9] Martinez – Galvez G, Zambrano JM, Diaz Soto JC, et al. TrkB gene therapy by adeno – associated virus enhances recovery after cervical spinal cord injury [J]. *Experimental neurology*, 2015, 276: 31–40.
- [10] Gill LC, Gransee HM, Sieck GC, et al. Functional recovery after cervical spinal cord injury: Role of neurotrophin and glutamatergic signaling in phrenic motoneurons [J]. *Respiratory physiology & neurobiology*, 2015, doi:10.1016/j.resp.2015.10.009.
- [11] Geremia NM, Pettersson LM, Hasmatali JC, et al. Endogenous BDNF regulates induction of intrinsic neuronal growth programs in injured sensory neurons [J]. *Experimental neurology*, 2010, 223(1): 128–142.
- [12] Hashimoto M, Heinrich G. Brain – derived neurotrophic factor gene expression in the developing zebrafish [J]. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 1997, 15(8): 983–997.
- [13] De Felice E, Porreca I, Alleva E, et al. Localization of BDNF expression in the developing brain of zebrafish [J]. *Journal of anatomy*, 2014, 224(5): 564–574.
- [14] Germana A, Sanchez – Ramos C, Guerrero MC, et al. Expression and cell localization of brain – derived neurotrophic factor and TrkB during zebrafish retinal development [J]. *Journal of anatomy*, 2010, 217(3): 214–222.
- [15] Becker T, Wullmann MF, Becker CG, et al. Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish [J]. *The Journal of comparative neurology*, 1997, 377(4): 577–595.
- [16] Pan HC, Lin JF, Ma LP, et al. Major vault protein promotes locomotor recovery and regeneration after spinal cord injury in adult zebrafish [J]. *The European journal of neuroscience*, 2013, 37(2): 203–211.
- [17] Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins [J]. *Annual review of neuroscience*, 1996, 19: 289–317.
- [18] Reimer MM, Sorensen I, Kuscha V, et al. Motor neuron regeneration in adult zebrafish [J]. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 2008, 28(34): 8510–8516.
- [19] Li Y, Ling K, Hu J. The emerging role of Arf/Arl small GTPases in cilia and ciliopathies [J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2012, 113(7): 2201–2207.

[收稿日期 2015-12-28; 责任编辑 赵菊梅]

江南大学医学院神经科学中心申延琴教授实验室介绍

江南大学位于美丽的太湖之滨 – 无锡, 是一所教育部直属的 211 重点院校。江南大学无锡医学院成立于 2012 年, 目前已经吸引大量海内外优秀人才加盟。医学院神经科学中心申延琴教授实验室致力于神经退行性疾病及中枢神经损伤及修复的研究。本实验室利用小鼠和斑马鱼两种模式动物建立帕金森病、脊髓损伤和脑损伤模型, 研究神经胶质细胞、自噬和神经干细胞在神经变性、损伤及修复中的作用机制, 并致力于筛选传统中药单体成分和神经粘附分子对于帕金森病和脊髓损伤及脑损伤的治疗作用。实验室现有教授 1 名, 副教授 1 名, 讲师 1 名, 博士后 1 名, 科研助理 1 名, 研究生 8 名, 是一支充满活力和凝聚力的科研团队。团队拥有省级人才 1 名, 无锡市级人才 2 名, 3 人具有海外留学背景, 4 人具有博士学位。团队目前承担国家自然科学基金及江苏省各类基金数项。团队诚邀生物医学相关专业背景的优秀研究人员和学生加盟。