

聪圣胶囊对去皮层血管大鼠前脑脑源性神经营养因子及酪氨酸激酶 mRNA 作用的实验研究^{*}

司银楚 朱培纯 许 红 吴海霞

内容提要 目的 研究聪圣胶囊对去皮层血管模型大鼠前脑脑源性神经营养因子(BDNF)mRNA、酪氨酸激酶(trkB)mRNA 作用及机理。方法 建立去大鼠脑皮层血管模型,用原位杂交方法测定聪圣胶囊对其模型大鼠 BDNF mRNA、trkB mRNA 表达。结果 发现去皮层血管后,聪圣胶囊对大鼠大脑皮质、海马中 BDNF mRNA、trkB mRNA 表达明显降低,海马 CA₁ 区下降最明显,大细胞基底核未见有 BDNF mRNA 的表达,而存在 trkB mRNA 的表达。结论 聪圣胶囊通过增强 BDNF mRNA、trkB mRNA 的表达,促进 BDNF 及 trkB 蛋白的合成,挽救将要变性的神经元,维持它们的存活。

关键词 聪圣胶囊 去皮层血管模型 脑源性神经营养因子 酪氨酸激酶 mRNA

Experimental Study on Effect of Congsheng Capsule on Expression of Brain Derived Neurotrophic Factor and Tyrosinkinase mRNA in Forebrain of Rats after Cortical Devascularization SI Yin-chu, ZHU Pei-chun, XU Hong, et al *Department of Anatomy, Beijing University of TCM, Beijing (100029)*

Objective: To study the effect and mechanism of Congsheng Capsule(CSC) on brain derived neurotrophic factor(BDNF) and tyrosinkinase(trkB) mRNA in forebrain of rats after cortical devascularization. **Methods:** The rat devascularization model was established, and expression of BDNF mRNA and trkB mRNA were determined by hybridization in situ method. **Results:** Expression of BDNF mRNA and trkB mRNA reduced obviously in the cerebral cortex and hippocampus of devascularization model, especially in hippocampal CA₁ subregion. There was trkB mRNA but no BDNF mRNA expression in the macrocyte basal nuclei(MBN). CSC significantly increased the decreased BDNF and trkB mRNA in cortex, hippocampus and MBN compared with placebo group. **Conclusion:** CSC could salvage the degenerating neurons and maintain their survival after cortical devascularization by increasing the expression of BDNF and trkB mRNA and improving the synthesis of BDNF mRNA and trkB protein.

Key words Congsheng Capsule, model of cortical devascularization, brain derived neurotrophic factor, tyrosinkinase, mRNA

脑源性神经营养因子(BDNF)是于1989年从猪脑中提取出来的,其氨基酸序列与神经生长因子(NGF)有50%~60%的同源性,因而将其归于 Neurotrophin 家族。最早发现它能促进培养的鸡胚背根神经节(DRG)的神经元存活,后来一系列实验研究发现 BDNF 对基底前脑胆碱能神经元等的发生和存活都具有作用。BDNF 还影响突触及神经元的可塑性、神经递质以及其他神经营养因子的合成,近来还证明有直接参与调节学习和记忆过程⁽¹⁾。BDNF 及其高亲和力受体酪氨酸激酶 B(trkB)在脑内的分布基本是一致的。伤害性刺激如机械损害等能提高 BDNF、trkB 及

其 mRNA 的水平,而 Alzheimer 病脑内 BDNF、BDNF mRNA 的表达降低⁽²⁾。本研究拟用去大鼠脑皮层血管建立痴呆模型,观察前脑 BDNF mRNA、trkB mRNA 的表达,并研究聪圣胶囊对 BDNF mRNA、trkB mRNA 表达的影响。

材料和方法

1 药物 聪圣胶囊由何首乌、荷叶梗、漏芦、肉苁蓉 4 味中药组成,每克浸膏含生药 35.72g,由吉林辽源市亚药业股份有限公司提供,批号 970606。

2 动物及分组 雄性 Wistar 大鼠 4~5 个月龄,体重 250~300g,42 只,北京中医药大学动物中心提供。随机分为 3 组:假手术组(2 只),对照组(20 只),给药组(20 只)。术后假手术组、对照组大鼠灌服无菌

^{*}“九五”国家科技攻关课题(No. 96-906-09-03)

北京中医药大学解剖教研室(北京 100029)

双蒸水,给药组每天灌服聪圣胶囊(0.25g/kg),每天2次,每次1.3ml,疗程分别为15、30天。

3 造模及标本制作

3.1 造模 10%水合氯醛(0.4ml/100g)麻醉下,剪开大鼠头部皮肤,暴露颅骨,用牙科钻在左侧颅骨钻6个孔,用眼科剪翻开左侧颅骨,暴露左侧脑硬脑膜,用虹膜剪轻轻剪开硬脑膜,露出软脑膜,使用沾有生理盐水的棉签轻轻擦拭(在解剖显微镜下),至软脑膜镜下见不到血管为止,用棉签轻轻按压止血(但仍有少量出血)缝合皮肤。假手术组手术方法同模型组,不同之处在于颅骨打开后不打开硬脑膜即缝合皮肤。

3.2 标本制作 给药15、30天后分别处理3组大鼠,即用10%的水合氯醛(0.4ml/100g)麻醉,用生理盐水心脏灌注冲洗后,再用0.1mol/L PB配制的4%多聚甲醛(pH7.2~7.4)灌注,取脑,后固定2~4h,放入20%蔗糖(0.1mol/L PB配制)内4℃保存,切片前将脑组织液氮冻融,将配对的对照组和给药组大鼠固定在同一个载物托上,恒温冷冻切片机切片(30μm),贴在同一张载玻片上,放入切片盒内,低温冷冻保存。

4 BDNF检测 采用³⁵S 3'末端标记BDNF寡核苷酸原位杂交方法。BDNF寡核苷酸探针按Middlen(1991)BDNF的250~298cDNA片段(5'-3')CTCCAGAGTCCCATGGGTCCGCACACCTGGGTAGGCCAAGCTGCCTTG,由美国LIFE TECHNOLOGIES公司合成。采用Dupont NEN product公司寡核苷酸3'末端标记药盒(NEP-100),用³⁵S标记,所用α [³⁵S]dATP由Dupont NEN product公司提供(活性为1250 Ci/mmol,10pmol/μl),按药盒说明书操作。

5 trkB检测 用3'末端生物素标记的trkB寡核苷酸酪胺加强原位杂交方法。trkB寡核苷酸探针按middlen(1991)trkB的1879-1920cDNA片段(5'-3')CTGCGACTGCGTCAGCTCGGTGGGCGGGTTACCTCTGC-CAT,由美国LIFE TECHNOLOGIES公司合成,生物素3'末端标记药盒标记,并用TSA药盒生物素化酪胺进行信号放大。药盒均采用NEN product公司产品,按药盒说明书操作。

6 图像分析及统计学处理 BDNF免疫组化及trkB mRNA原位杂交结果用CMIAS 8真彩病理图像分析系统(中国航空航天大学图像分析中心)进行分析,统计每个视场中阳性反应的面密度(所选视野中阳性总面积与系统统计场面积的比值,反映阳性细胞大小,即细胞萎缩状态),面积和光密度(系统对彩色图像颜色深浅的一种表达方式,反映表达的强弱),两组间

资料统计用t检验。

结 果

1 聪圣胶囊对大鼠大脑皮质及海马BDNFmRNA的影响 在³⁵S 3'末端标记BDNF寡核苷酸原位杂交中,对照组大鼠大脑皮质BDNFmRNA的表达明显降低,阳性细胞数量减少,银颗粒降低,给药组大鼠大脑皮质BDNFmRNA的表达比对照组明显增强。在海马中BDNFmRNA的表达:对照组CA₁~CA₄区阳性细胞减少,银颗粒明显减低,且CA₁区降低最显著;给药组海马CA₁~CA₄区BDNFmRNA均有增强(图略)。

2 聪圣胶囊对大鼠大脑皮质、海马、大细胞基底核trkB mRNA的影响 trkB mRNA在假手术组大鼠大脑皮质、海马、大细胞基底核的表达:在皮质主要集中分布于皮质的II~V层,I、VI层有散在表达;扣带皮质、杏仁皮质中trkB mRNA的表达较强;海马中trkB mRNA均表达在CA₁~CA₄区锥体细胞层以及齿状回颗粒细胞层。在大细胞基底核的部位,苍白球的腹侧可见胞体明显大而深染的trkB mRNA阳性细胞。对照组大鼠大脑皮质中trkB mRNA的表达明显减弱,海马结构中锥体细胞层和齿状回的颗粒细胞层的trkB mRNA的表达也明显减弱,CA₁区最明显。对照组大鼠的大细胞基底核trkB mRNA表达降低,给药组大鼠trkB mRNA在皮质、海马、大细胞基底核中的表达明显增强(见表1、2,均为30天的结果)。

表1 3组大鼠大脑皮质中trkB mRNA阳性细胞面密度和光密度值测定结果的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	面密度	光密度
假手术	9	0.22 ± 0.01 *	210.33 ± 10.32 *
对照	9	0.08 ± 0.01	97.23 ± 16.44
给药	9	0.20 ± 0.01 *	190.80 ± 26.72 *

注:与对照组比较,*P<0.01

表2 3组大鼠海马中trkB mRNA阳性细胞面密度和光密度值测定结果的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	面密度	光密度
假手术	9	CA ₁	0.14 ± 0.01 **
		CA ₂	0.16 ± 0.01 **
		CA ₃	0.23 ± 0.02 **
		CA ₄	0.18 ± 0.01 **
对照	9	CA ₁	0.09 ± 0.02
		CA ₂	0.06 ± 0.01
		CA ₃	0.14 ± 0.03
		CA ₄	0.12 ± 0.02
给药	9	CA ₁	0.13 ± 0.01 **
		CA ₂	0.14 ± 0.01 **
		CA ₃	0.20 ± 0.03 **
		CA ₄	0.16 ± 0.01 *

注:与对照组同部位比较,*P<0.05,**P<0.01

讨 论

本研究中观察到大鼠去皮层血管后,无论存活 15 天或 30 天(本结果为 30 天者,15 天结果与之相同),皮质、海马、大细胞基底核中 BDNF mRNA、trkB mRNA 的表达均下降,特别是扣带皮质、海马中 CA₁ 区下降最明显,锥体细胞变性萎缩,数目减少,均可见呈萎缩状或空泡状的阳性细胞;大细胞基底核的阳性细胞呈萎缩状,胞体减小,突起纤细或消失,这可能是由于神经元逆行性变性导致的,可能与 Alzheimer 病脑中神经营养因子表达下降的机理相似⁽²⁾,但与脑缺血不同。脑缺血导致 BDNF、trkB 及其 mRNA 的表达增加⁽³⁾,可能是脑缺血激活了神经元的保护机制,还没有造成神经元组织形态上的损害。而我们观察的大鼠为去脑皮层血管后存活 15、30 天,皮质、海马、大细胞基底核已出现了明显的变性、坏死,所以 BDNF mRNA、trkB mRNA 的表达下降。

本研究观察到大细胞基底核有 trkB mRNA 的表达,但没有 BDNF mRNA 表达,与以往的工作报道⁽⁴⁾是相吻合的。大细胞基底核的 BDNF 蛋白是靶源性的依据是(1)大细胞基底核胆碱能纤维广泛投射到新皮质⁽⁵⁾(2)免疫组化和原位杂交方法证实,靶区新皮质、内嗅皮质、海马存在高表达的 BDNF 蛋白和 BDNF mRNA⁽⁶⁾(3)基底前脑胆碱能神经元 BDNF 蛋白、trkB 蛋白及其 mRNA 高表达⁽⁷⁾(4)在皮质、海马内注射¹²⁵I-BDNF,在基底前脑核群中,发现放射性标记的阳性神经元⁽⁸⁾。BDNF 在靶组织皮质、海马的神经元和胶质细胞内合成、分泌,作用于 trkB 受体,同样 trkB 受体除了本身合成之外,也可能是靶源性的,来源于新皮质,经逆行性运输到大细胞基底核胆碱能神经元胞体,从而发挥维持胆碱能神经元的存活及正常生理功能的作用。

我们另外的工作证实,聪圣胶囊能促进大细胞基底核乙酰胆碱酯酶(AChE)、胆碱乙酰转移酶(ChAT)的表达⁽⁹⁾,因此,我们认为聪圣胶囊可能促进靶源性的 BDNF、trkB 的合成、分泌,作用于大细胞基底核,对胆碱能神经元起到营养保护作用,以挽救其变性、坏死。但是我们还观察到 BDNF、trkB 及其 mRNA 在脑内各区分布十分一致。文献报道 BDNF、trkB 及其 mRNA 还能存在于同一细胞内,包括大细胞基底核的胆碱能神经元⁽¹⁰⁾。近来还强调神经营养因子自分泌和旁分泌的作用方式。所以本实验也不能排除聪圣胶囊能促进脑内神经元或胶质细胞(另文报道)的自分泌和旁分泌的作用。

综上所述,在大鼠去皮层血管后,聪圣胶囊可能激活皮质、海马等处神经元 BDNF mRNA、trkB mRNA 的表达,促进 BDNF、trkB 的合成,由此推测其主要通过其旁分泌和自分泌方式作用于自身或邻近神经元,也可能通过靶源性的方式作用于大细胞基底核的胆碱能神经元,以保护皮质、海马、大细胞基底核神经元免遭变性坏死。

参 考 文 献

1. Falkenberg T, Mohammed AK, Heariksson B, et al. Increased expression of brain derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with imported spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett* 1992;138:153—156.
2. Appel LSH. Unifying hypothesis for cause of amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson and Alzheimers disease. *Ann Neurol* 1981;10:499—505.
3. Akedda A, Onodera A, Sugimoto A, et al. Coordinated expression of messenger RNAs for nerve growth factor, brain derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience* 1993;55:23—31.
4. Phillips HS, Hains JM, Laramée GR, et al. Widespread expression of BDNF but not NT-3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science* 1990;250:290—294.
5. Luiten PGM, Gaykema RPA, Traber I, et al. Cortical projector patterns of magnocellular basal nucleus subdivisions as revealed by anterogradely transported phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Brain Res* 1989;413:229—250.
6. Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, et al. Expression brain-derived neurotrophic factor protein in the adults rat central nervous system. *Neuroscience* 1997;78(2):431—448.
7. Distefano PS, Fredman B, Radziejewski C, et al. The neurotrophin BDNF, NT-3 and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron* 1992;8:983—993.
8. Seiler M, Schwab ME. Specific retrograde transport of nerve growth factor(NGF) from neocortex to nucleus basalis in the rat. *Brain Res* 1984;300:33—39.
9. 司银楚,朱培纯,许红,等.聪圣胶囊对去皮层血管大鼠行为学及前脑 AChE、ChAT 的影响. *北京中医药大学学报* 2001;24(1):21—24.
10. Miranda RC, Sohrabji F, Toran-Aderand CD. Neuronal localization of mRNA for neurotrophins and their receptors in the developing central nervous systems a potential for autocrine interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6439—6443.

(收稿 2000-11-27 修回 2001-08-18)