

- 2 Mackowiak M, Chocyk A, Markowicz-Kula K, et al. Neurogenesis in the adult. *Pol J Pharmacol*, 2004, 56:673-687.
- 3 Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 1986, 17:472-476.
- 4 李忠仁, 主编. 实验针灸学. 北京: 中国中医药出版社, 2003. 327.
- 5 Yagita Y, Kitagawa K, Sasaki T, et al. Differential expression of Musashi1 and nestin in the adult rat hippocampus after ischemia. *J Neurosci Res*, 2002, 69: 750-756.
- 6 刘鹏翀, 陆世铎, 黄娅林, 等. 成年鼠缺血性脑损伤诱导 nestin 的表达. *生理学报*, 2002, 54:294-299.
- 7 史冬梅, 周畅, 谢佐平. 神经干细胞有丝分裂过程中 nestin 表达变化. *神经解剖学杂志*, 2003, 19:119-123.
- 8 Jin K, Minami M, Lan JQ, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:4710-4715.
- 9 Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke*, 2001, 32:1890-1896.
- 10 Iwai M, Sato K, Omori N, et al. Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gyrus after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22:411-419.
- 11 Liu PC, Yang ZJ, Qiu MH, et al. Induction of CRMP-4 in striatum of adult rat after transient brain ischemia. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24: 1205-1211.
- 12 Li Y, Chopp M. Temporal profile of nestin expression after cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res*, 1999, 830:1-10.
- 13 郑青立, 龚薇薇, 王玲, 等. 脑缺血再灌注损伤后神经细胞巢蛋白和干细胞因子基因表达. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26:589-591.
- 14 袁华, 龙华, 李玲. 康复训练对脑梗死大鼠皮质 S-100、GFAP 和 Nestin 表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2003, 25:520-523.
- 15 李东培, 汪华侨, 姚志彬. 巢蛋白的表达模式及其功能. *解剖学研究*, 2004, 26:216-218.

(修回日期:2005-09-11)

(本文编辑:阮仕衡)

· 研究快报 ·

运动训练对小鼠脑局灶缺血后脑源性神经营养因子 mRNA 表达水平的影响

高谦 吴宗耀 姚志彬 袁群芳

脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 在脑内分布广泛, 大脑皮层、海马及基底前脑是其主要分布区, 在基底前脑的胆碱能神经元及其末梢发现了 BDNF 的受体^[1-3]。运动促进脑损伤后胆碱能神经元轴突的出芽再生, 可能与 BDNF 的增多有重要关系。本研究旨在探讨运动训练是否可使小鼠大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 后 BDNF mRNA 表达水平发生改变。

材料与方法

一、材料

选雄性 C57 BL/6J 小鼠 26 只 (由中山大学医学院动物实验中心提供), 体重为 20~30 g, 鼠龄为 3~5 个月。

二、方法

(一) 动物分组和运动训练方法

按 Bederson 等^[4]的方法, 建立小鼠 MCAO 模型, MCAO 术后第 3 天开始运动训练。随机将 26 只小鼠分为运动 I 组 (9 只), 运动 II 组 (9 只) 及对照组 (8 只)。运动 I 组每天于跑笼中训练 1 h, 共训练 90 d; 运动 II 组先于跑笼中运动 15 d, 停止运动 30 d, 再置于跑笼中运动 45 d, 每天训练 1 h, 其它处理与 I 组相同; 对照组每次置于跑笼中, 但跑笼不转动。90 d 后断头取

大脑。

(二) BDNF 基因 mRNA 表达的定量 RT-PCR 测定

1. 脑组织中 RNA 的提取: 小鼠 BDNF 引物是根据鼠神经细胞上 BDNF mRNA 全序列^[5] (gene bank accession no. X55573) 而设计的, 其序列为 F 5'-GGA TGA GGA CCA GAA GGT TCG-3, 其位点为 296~316; R 5'-ACC CTC ATA GAC ATG TTT GCG G-3', 其位点为 460~439, 由上海生工生物工程公司合成, 扩增长度为 164 bp, 使用浓度为 10 nmol/ml。脑组织中 RNA 的提取按 TRIzol Reagent 试剂盒说明书进行, 电泳得到 5S、18S、28S 总 RNA 条带 (图 1)。同时用紫外分光光度计 (Pharmacia Ultrospec 2000) 测 A_{260} 和 A_{280} 的 OD 值 ($1\text{OD} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$), 计算所提取的总 RNA 量, 并使每次 A_{260}/A_{280} 比值保持在 1.8 以上, 置于 -70°C 下保存待测, 于 1 周内测定完毕。

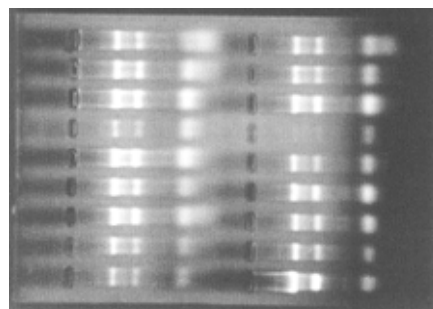


图 1 TRIzol 法提取的神经细胞内总 RNA 见 28S、18S、5S 三条带

作者单位: 100853 北京, 解放军总医院康复医学科 (高谦); 第三军医大学附属西南医院康复科 (吴宗耀); 中山大学医学院解剖教研室 (姚志彬、袁群芳)

2. 逆转录(RT)-单链 cDNA 的合成:等量取上述每个标本总 RNA 2 μg ,分别逆转录成 cDNA。BDNF 反应体系(20 μl): $5 \times \text{RT Reaction Buffer}$ 2 μl , 10 mmol/L dNTP 1 μl ,上、下引物各 0.5 μl (12 pM),MMLV-逆转录酶 10 u(上海生工生物工程公司产品),样品 RNA 2 μg ,Rnasin 10 u, DEPC 外理的 dH_2O 加至 10 μl 。反应条件:37℃ 水浴下 60 min,95℃ 下 5 min,即逆转录成 cDNA,作为模板,于 -20℃ 下保存待测。

3. RT-PCR 反应:分别取上述逆转录的产品 cDNA 10 μl 与 BDNF 引物作 PCR。反应体系:模板 cDNA 10 μl ,Taq DNA 聚合酶 1 μl , $5 \times \text{RT Reaction Buffer}$ 4 μl , 10 mmol/L dNTP 2 μl ,引物上游 0.5 μl 、下游 1 μl 加水至 30 μl ,混匀后加入适量石蜡油,离心数秒钟,按下列条件扩增:93℃ 预变性 3 min,此后 93℃ 30 s $\rightarrow$ 57℃ 30 s $\rightarrow$ 72℃ 45 s,共做 35 个循环后,72℃ 延伸 5 min,取反应管中 RT-PCR 产物 5 μl 与 1 μl 溴酚兰指示剂充分混匀后,于 2% 琼脂糖凝胶上电泳(10 V/cm)10~30 min,于凝胶成像及分析装置上观察结果。

4. RT-PCR 定量检测 cDNA 含量(即 mRNA 表达量):RT-PCR 割胶纯化,严格按 Qiaagen 公司纯化试剂盒(Qiaex II Gel, Extraction Kit)的说明书进行。纯化后的 RT-PCR 产物,在紫外分光光度计上测 A_{260} 的 OD 值(A_{260} 的 1 OD = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cDNA),测得 cDNA 浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$,取 5 μl (1 μg cDNA)做标准曲线,行系列的 10 倍稀释($10^{-3} \sim 10^{-11}$ μg cDNA),各样品同样亦取 5 μl 一起进行 PCR。PCR 的反应体系(20 μl):RT-PCR 产品 5 μl ,标准品行 10 倍系列稀释后亦各取 5 μl ,Tag 酶 1.5 μl , $5 \times \text{RT Reaction Buffer}$ 6 μl , 10 mM dNTP 2 μl ,上、下游引物各 1 μl ,加水至 20 μl ,混匀后加入适量石蜡油离心数秒钟。按下列条件扩增:93℃ 预变性 3 min,然后 94℃ 45 s,57℃ 45 s,72℃ 1 min,共做 30 个循环后,72℃ 延伸 5 min,取反应管中下层液相即 RT-PCR 产物 5 μl ,与 1 μl 溴酚兰指示剂充分混匀后,于 2% 琼脂糖凝胶上电泳(10 V/cm)20~30 min,见图 2,3。各样品条带的峰面积值均在标准品峰面积值范围之内,用标准品的浓度和峰面积值在凝胶成像和分析装置上照相,用 Gel Base/Gel Blot Support 软件对底片的电泳带行扫描分析。

三、统计学分析

用 SPLM 软件计算,以标准品浓度与峰面积做标准曲线,并进行曲线拟合,选出最优曲线,代入样本峰面积,算出 cDNA 浓度,即为 mRNA 初始表达量。用非参数多样本比较,Kruskal-Wallis 检验 3 组差别。用 Wilcoxon 检验做两两比较。

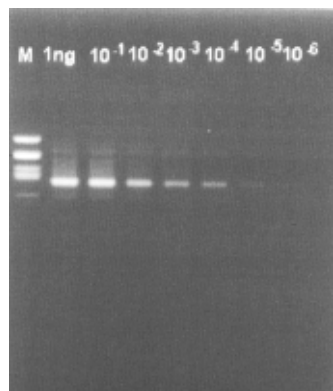


图2 BDNF 基因标准品神经细胞内 RT-PCR 扩增产物

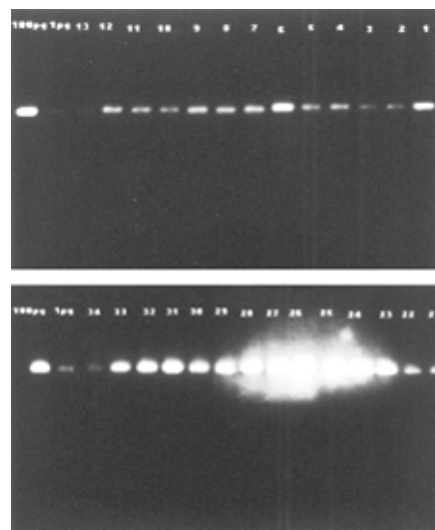


图3 BDNF 样品神经细胞内 RT-PCR 扩增产物

结 果

做标准曲线后,进行曲线拟合,包含所有标品值的曲线为最拟合曲线,即 $\text{Ln } y = a + b \text{Ln}(1000 - x)$, [$a = 14.442, b = -2.667, r = -0.8332, P = 0.0199$],见图 4。

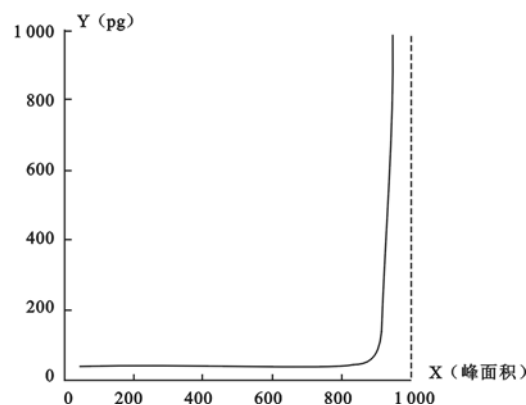


图4 脑组织 BDNF mRNA 表达量的标准曲线

根据样本的峰面积,算出 3 组 mRNA 的初始表达量,详见表 1。样本间两两比较如表 2。

表 1 小鼠 MCAO 后脑组织 BDNF mRNA 表达水平的中位数与极差(pg mRNA/gm 总 RNA)

组 别	样本数	中位数	极差
运动 I 组	9	1 833	3 583
运动 II 组	9	1 139	5 650
对照组	8	233	305

注:经 Kruskal-Wallis 检验, $H = 13.8, P < 0.01$,3 组差异有统计学意义

表 2 样本间两两比较 Wilcoxon 检验结果

样本间两两比较	样本含量		平均秩和之差
	Na	Nb	$Ra' - Rb'$
运动 I 组与对照组	9	8	13.3
运动 II 组与对照组	9	8	10.9
运动 I 组与运动 II 组	9	9	3.1

注:运动 I 组与对照组比较, $P < 0.01$;运动 II 组与对照组比较, $P < 0.01$;运动 I 组与运动 II 组比较, $P > 0.05$

讨 论

我们的研究发现:在小鼠 MCAO 后 90 d,适量运动训练可以增加 MCAO 后小鼠大脑 BDNF mRNA 表达水平,有利于小鼠 MCAO 的功能恢复。运动 II 组与对照组差异有统计学意义,而与运动 I 组差异无统计学意义,说明 MCAO 后,停止一段时间训练,再次进行运动训练,仍能提高 BDNF mRNA 表达水平。

有研究提示^[6],BDNF 对神经元的存活与功能维持有重要作用。Neeper 等^[7]认为:运动可增加海马、皮层的 BDNF mRNA 的表达水平。Ghosh 等^[6]用鼠培养的胚胎神经元进行研究后发现:内源性 BDNF 是皮层神经元的营养因子,电压敏感性钙通道的激活可促进 BDNF 的表达,有利于皮层神经元的存活。也就是说,皮层神经元的存活是活动依赖型(activity-dependent),它的基础是神经营养因子,BDNF 是其中重要的一员。众所周知,BDNF 在皮层广泛表达^[3],神经元活动可调节它的分泌。外界刺激与运动训练使神经元的活动增加,代谢增强,有利于神经元的存活及可塑性。近年,对神经营养因子与神经元的可塑性的关系有了更深入的认识。对视觉的研究发现,BDNF 受生理性刺激的调节,如视觉冲动。用毒素或将动物置于黑暗中阻滞感觉冲动进入视皮层,可以快速下调 BDNF mRNA 表达水平。同样,用生理性刺激,如改变侧脑室渗透压或刺激产生 LTP,可以上调 BDNF mRNA 表达水平。敲除 BDNF 基因鼠,它的 LTP 显著下降^[8]。而将腺病毒介导的 BDNF 基因转入 BDNF 基因敲除的鼠海马 CA1 区,LTP 又恢复,这些均说明,BDNF 对大脑的可塑性有着十分重要的意义^[8,9]。

脑缺血时,BDNF 可上调 TrkB 蛋白,防止神经元死亡^[10],BDNF 也可直接作用于神经元,防止缺血诱导的神经元死亡^[11,12]。有研究认为,颈脊神经轴突切断后,BDNF 可以防止红核神经元的萎缩,刺激 GAP43 的表达,促进轴突再生^[13]。本实验在 MCAO 后,用运动训练刺激,也上调了 BDNF mRNA 水平,得出了类似的结果。而运动 II 组与运动 I 组差异无统计学意义,与对照组差异有统计学意义,说明运动训练停止后,再次治疗仍能有效促进 BDNF mRNA 表达。

按照目前的认识,脑缺血的功能恢复主要包括两个过程:早期恢复主要是水肿的消失,“半暗带区”的保护,中后期的功能恢复主要是轴突的发芽,突触的可塑性等。运动训练诱导 BDNF mRNA 表达增加,增加了神经元的可塑性,有利于神经元的存活,促进了功能恢复。而对照组不运动,功能恢复较运动组差,提示运动训练有效,脑缺血后的功能恢复不仅仅是自然恢复,康复训练的效果更大。

本研究在实验方法上也进行了探讨。选用 C57 BL/6J 小鼠,因其运动能力比其它鼠强,适于进行慢性长期运动实验。跑笼运动方式是一种主动运动方式,易于计算运动量。设计每天运动 1 h,参考了以往抗衰老运动实验。这样可保证运动量

不至于过小,达不到干预目的;同时也不会造成运动量过大,因其不同于耗竭运动,比较符合生理特点。临床上常常发现,脑卒中患者在出院停止康复训练一段时间后,功能下降,恢复期再次进行运动训练,仍然有效。设计运动 II 组的目的,在于观察脑卒中后恢复期是否存在“第二治疗窗”;时间点的选择,如停止运动 45 d,主要是为了消除前期运动的影响,从经济上考虑,也不能停止太长时间。由于 BDNF mRNA 在脑组织中含量小,本研究采用内参标 RT-PCR 法,定量分析,方法可靠,比传统的 RT-PCR 法进了一步。图 3 中,BDNF 样品 RT-PCR 扩增产物出现污染,但不影响结果。

参 考 文 献

- Chen J, Li Y, Chopp M. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAO in rat. *Neuropharmacology*, 2000, 39:711-716.
- Kawamoto Y, Nakamura S, Nakano S, et al. Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *Neuroscience*, 1996, 74:1209.
- Zhang Y, Pardridge WM. Conjugation of brain-derived neurotrophic factor to a blood-brain barrier drug targeting system enables neuroprotection in regional brain ischemia following intravenous injection of the neurotrophin. *Brain Res*, 2001, 889:49-56.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic estimation. *Stroke*, 1986, 17:472-476.
- Hayward AL, Oefner PJ, Sabatini S, et al. Modeling and analysis of competitive RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26:2511-2518.
- Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science*, 1994, 263:1618.
- Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, et al. Exercise and brain neurotrophins. *Nature*, 1995, 373:109.
- Andersberg G, Kokaia Z, Klein RL, et al. Neuropathological and behavioral consequences of adeno-associated viral vector-mediated continuous intrastriatal neurotrophin delivery in a focal ischemia model in rats. *Neurobiol Dis*, 2002, 9:187-204.
- Chen X, Li Y, Wang L, et al. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology*, 2002, 22:275-279.
- Ferrer L, Ballabriga J, Marti E, et al. BDNF up-regulates TrkB protein and prevents the death of CA1 neurons following transient forebrain ischemia. *Brain Pathol*, 1998, 8:253-261.
- Wang Y, Chang CF, Morales M, et al. Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor in ischemic brain injury. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 962:423-437.

(修回日期:2005-07-12)

(本文编辑:松 明)

欢迎订阅《中华物理医学与康复杂志》