

BDNF 在慢性不可预见性温和刺激应激大鼠海马星形胶质细胞中的表达

吴红芳, 金齐颖, 曹金英, 马原源, 张园园, 刘昊

摘要 目的 观察脑源性神经营养因子(BDNF)在慢性不可预见性温和刺激(CUMS)大鼠海马星形胶质细胞中的表达变化情况。方法 将60只成年大鼠随机分为应激组($n=30$)和对照组($n=30$),应激组大鼠给予CUMS,对照组每天随机抓取一次。分别采用糖水偏好实验、旷场实验和Morris水迷宫实验对两组大鼠进行行为学检测;免疫荧光双标法检测大鼠海马星形胶质细胞特异性标志蛋白胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和BDNF蛋白的共定位;采用Western blot法检测大鼠海马组织中BDNF蛋白表达水平。结果 ①糖水偏好实验:应激组大鼠的糖水消耗量及糖水偏好率均低于对照组($P<0.01$);②旷场实验:与对照组相比,应激组大鼠的行走总路程、中央活动时间、站立次数、修饰行为次数均偏低($P<0.01$);③Morris水迷宫实验:与对照组比较,应激组大鼠平均逃避潜伏期明显延长($P<0.01$);④GFAP和BDNF免疫荧光双标结果:部分星形胶质细胞的胞质内GFAP和BDNF有共定位;⑤Western blot法检测结果:CUMS后1、7、14d应激组大鼠海马组织中BDNF的表达水平均低于对照组($P<0.01$)。结论 CUMS大鼠海马星形胶质细胞中BDNF表达水平降低,这可能与抑郁症的发病机制有关。

关键词 慢性不可预见性温和刺激;海马;星形胶质细胞;脑源性神经营养因子;大鼠

中图分类号 R 749; R 322.81

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)09-1379-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.09.012

抑郁症虽然发病机制未明,但可以肯定的是长期慢性应激可以促进抑郁症的发生,严重威胁人类健康^[1]。近年来关于抑郁症发病机制的研究主要集中在非单胺类神经递质的假说,如细胞因子、谷氨酸及其受体、脑源性神经营养因子假说、下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)亢进假说等。星形胶质细胞在维持神经系统内环境稳定中起到至关重要的作用,其结构和功能异常可能与抑郁症发病存在联系。

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是神经元细胞存活及再生的关键因子之一^[2]。动物实验研究^[3-4]表明,BDNF表达异常与抑郁症有关。目前国内外抑郁症发病机制方面多集中于对海马神经元细胞的研究,对于海马部位星形胶质细胞的研究少有报道。该研究建立大鼠抑郁症模型,观察大鼠海马星形胶质细胞BDNF表达情况,以期对抑郁症的发病机制研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂 ①实验动物:成年清洁级(SPF)SD大鼠(雄性,体质量160~220g)60只,(华北理工大学动物饲养实验中心提供),实验前先给予7d常规适应性饲养。饲养条件:室温恒定(22~25℃),每笼饲养3~5只,昼夜节律(12h/12h),自由获取食物和自来水。②主要试剂:兔抗BDNF多克隆抗体购自上海Protein Tech公司;小鼠抗大鼠 β -actin单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司;免疫印迹相关试剂购自武汉博士德生物工程有限公司;羊抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、羊抗兔IgG/Alexa Fluor488、羊抗鼠IgG/Alexa Fluor647均购自北京博奥森生物技术有限公司;石蜡切片机(HZ1220)、激光共聚焦显微镜(TCSP8 STED)购自德国徕卡公司。

1.2 实验大鼠的处理 采用随机数字表法将大鼠分为两组:①对照组:共30只,不做特殊处理;②应激组:共30只,给予慢性不可预见性温和刺激(chronic unpredictable mild stimulation, CUMS)处理。应激如下:鼠笼摇晃15min;行为束缚24h;鼠笼45°倾斜24h;4℃的冰水游泳5min;42℃的热水游泳5min;禁水24h;禁食24h;双耳电击5s两次(0.8mA);夹鼠尾60s;潮湿垫料24h;黑白颠倒(如持续光照24h或持续黑暗24h)。每天随机选取1种刺激方法,但确保同种刺激不连续使用,共进行28d。对照组无特殊处理,除每天抓取1次。应激结束后第1、7、14天处死应激组和对照组大鼠。

1.3 行为学检测 ①糖水偏好实验:实验前先让

2018-05-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81201048)

作者单位:华北理工大学附属医院神经内科,唐山 063000

作者简介:吴红芳,女,硕士研究生;

刘昊,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: liuhao938@163.com

大鼠禁水禁食 1 d ,把两个完全相同水瓶放在每个鼠笼内 ,200 ml 1% 的糖水和 200 ml 的纯净水分别灌入两水瓶内 ,双瓶供饮 ,确保水瓶完好无滴漏 ,测量糖水和纯净水的消耗量(60 min 内) ,计算大鼠的糖水偏好率 糖水偏好率(%) = 糖水消耗量(ml) / 总液体消耗量(ml) × 100% 。② 旷场实验: 造模成功后 ,每天同一时间段内将 1 只大鼠放入旷场中心方格(规格: 长 120 cm ,宽 120 cm ,高 35 cm)内 ,使用鼠博士视频分析仪进行记录 ,主要包括: 行走总路程、中央活动时间、竖立次数和修饰次数。③ Morris 水迷宫实验: 连续 3 d 大鼠在 1 min 内找到水下平台的时间 ,并利用相关仪器记录 ,即逃避潜伏期 ,每天 6 个循环。根据 3 d 的测试结果计算空间记忆成绩。

1.4 免疫荧光双标 ① 标本制备: 将各组大鼠麻醉后行多聚甲醛灌流固定 ,冰冻切片 ,片厚度为 15 μm 。② 免疫荧光双标染色: 将冰冻切片从 -80 ℃ 冰箱取出 ,室温放置 30 min ,按免疫组化学步骤进行免疫荧光双标染色 ,一抗混合液(兔抗 BDNF 多克隆抗体和羊抗 GFAP 混合液) 使用浓度 1 : 100 ,阴性对照用 PBS 代替一抗 ,Alexa Fluor488 标记的羊抗兔和 Alexa Fluor647 标记的羊抗鼠荧光二抗混合液使用浓度 1 : 200 ,DAPI 复染核 ,封片剂封片并置于避光盒内 ,最后通过激光共聚焦显微镜观察并应用计算机进行数据采集和成像。

1.5 Western blot 检测大鼠海马 BDNF 的蛋白表达 大鼠完全麻醉后 ,断头取脑 ,在冰上剥离海马 ,提取组织总蛋白。用 BCA 蛋白试剂盒测定上清液中的蛋白质浓度 ,根据 BCA 法测定的蛋白上样量

(30 μg) 上样 ,之后 12% SDS-PAGE 电泳 ,再之 PVDF 膜电转 ,封闭 2 h (5% BSA) ,相应一抗兔抗 BDNF 多克隆抗体(1 : 400) 置于 4 ℃ 的冰箱内孵育过夜 相应的二抗羊抗兔 IgG(1 : 1 000) 室温孵育 1 h ,ECL 显色。内参 β-actin 应用同样的步骤操作并进行分析。计算目的蛋白的相对表达量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析 ,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,行为学结果采用 *t* 检验进行两组间显著性检验。Western blot 比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA) ,两两比较采用 *t* 检验。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖水偏好实验结果 在普通水消耗量上 ,应激组与对照组比较差别无意义(*P* > 0.05) ;但在糖水消耗量及糖水偏好率上 ,两组间差异均有统计学意义(*P* < 0.01) ,而且应激组较对照组均偏低 ,见表 1。

2.2 旷场实验和 Morris 水迷宫实验 应激组与对照组相比 ,大鼠的行走总路程、中央活动时间、竖立次数、修饰次数、平均逃避潜伏期差异均有统计学意义(*P* < 0.01) ,其中 ,与对照组比较 ,应激组的行走总路程、中央活动时间、竖立次数、修饰次数均降低 ,而平均逃避潜伏期较对照组明显延长 ,见图 1、表 2。

2.3 GFAP 和 BDNF 免疫荧光双标结果 GFAP 为绿色荧光 ,BDNF 为红色荧光 ,GFAP 和 BDNF 两种蛋白荧光 Merge 之后呈现黄色(见图 2A4、B4) ,表明部分星形胶质细胞的胞质内 GFAP 和 BDNF 同时表达 ,说明 GFAP 和 BDNF 有部分共定位。两者

表 1 两组大鼠糖水偏好实验结果(*n* = 30 $\bar{x} \pm s$)

| 项目 | 对照组 | 应激组 | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|--------------|--------------|--------------|------------|------------|
| 普通水消耗量(ml) | 18.01 ± 0.13 | 18.07 ± 0.17 | -1.688 | 0.097 |
| 糖水消耗量(ml) | 42.73 ± 0.18 | 27.99 ± 0.19 | 236.552 | <0.001 |
| 糖水偏好率(%) | 70.35 ± 0.19 | 60.77 ± 0.31 | 144.632 | <0.001 |

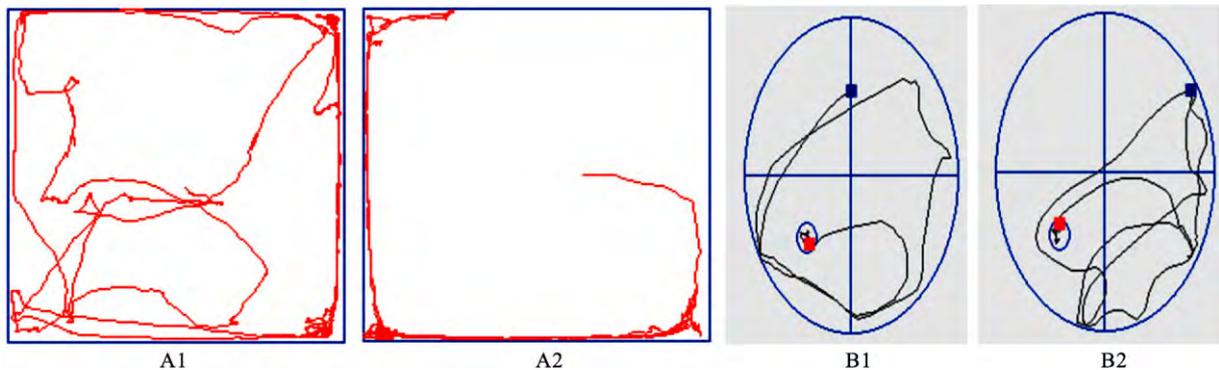


图 1 两组大鼠旷场实验和水迷宫实验轨迹图
A: 旷场实验; B: 水迷宫实验; 1: 对照组; 2: 应激组

表2 两组大鼠旷场实验和水迷宫实验结果($n=30$ $\bar{x} \pm s$)

| 项目 | 对照组 | 应激组 | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|-------------|--------------|--------------|------------|------------|
| 行走总路程(cm) | 62.39 ± 4.32 | 41.47 ± 3.55 | 20.486 | <0.001 |
| 中央活动时间(s) | 30.74 ± 4.26 | 17.64 ± 2.41 | 14.652 | <0.001 |
| 竖立次数 | 19.64 ± 0.78 | 11.51 ± 0.80 | 38.935 | <0.001 |
| 修饰次数 | 13.58 ± 0.79 | 7.46 ± 0.84 | 29.020 | <0.001 |
| 平均逃避潜伏期(s) | 9.80 ± 0.54 | 23.48 ± 0.74 | -81.387 | <0.001 |

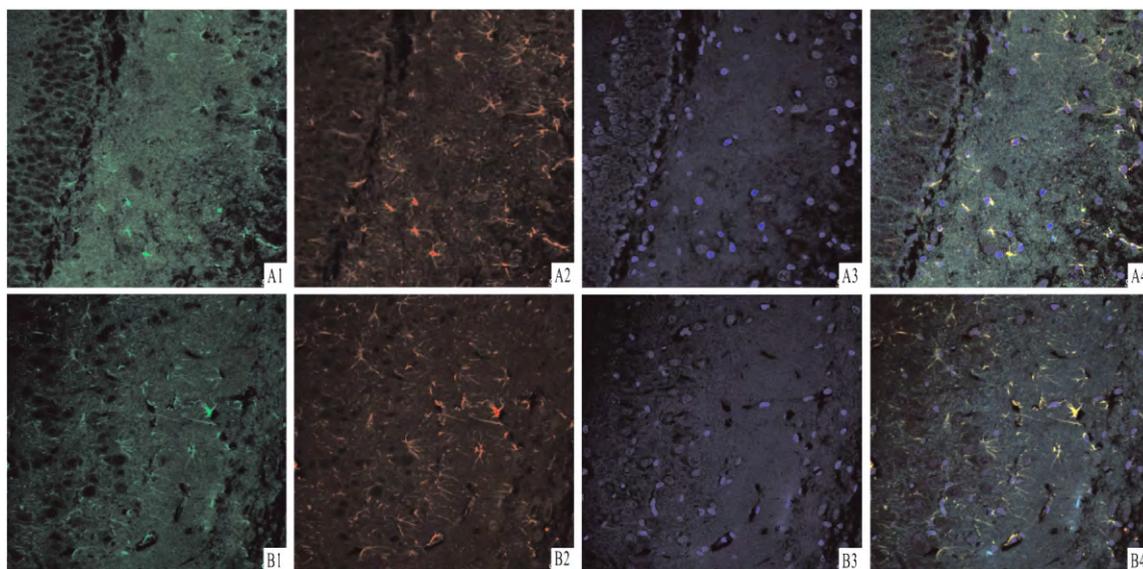


图2 GFAP 和 BDNF 免疫荧光双标结果 ×400

A: 对照组; B: 应激组(CUMS 后 1 d); 1: GFAP 细胞数; 2: BDNF 细胞数; 3: 细胞核; 4: GFAP-BDNF 双重染色细胞数

比较, 应激组(CUMS 后 1 d) GFAP-BDNF 双重染色的细胞数及 BDNF 均较对照组明显减少。见图 2。

2.4 各组大鼠海马组织中 BDNF 蛋白表达水平
对照组、应激组大鼠应激刺激结束后 1、7、14 d 海马组织中 BDNF 的蛋白表达水平分别为 (0.795 ± 0.023)、(0.313 ± 0.017)、(0.631 ± 0.013)、(0.719 ± 0.037), 差异有统计学意义 ($F = 761.304$, $P < 0.001$)。应激组蛋白表达水平虽逐渐增高, 但均低于对照组 ($P < 0.01$), 见图 3。

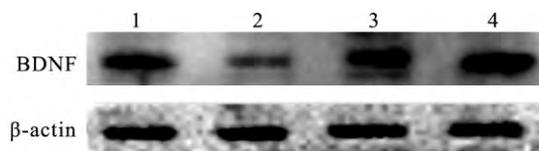


图3 各组大鼠海马组织中 BDNF 蛋白表达水平

1: 对照组; 2~4: 应激组(CUMS 后 1、7、14 d)

3 讨论

本实验行为学检测结果表明, CUMS 后大鼠表现出快感缺失、运动能力、探索行为、视空间和记忆力的减退等症状^[5], 说明给予大鼠 CUMS 能较好地反映抑郁症的主要症状。

BDNF 对维持神经元的分化、存活及可塑性具

有重要作用, 与抑郁症和焦虑有关^[6]。研究^[7-8]显示, 抑郁症的发生和严重程度与 BDNF 蛋白的异常表达存在联系, 但研究结果不一^[9-11]。本研究结果表明, CUMS 后 1、7、14 d 大鼠海马组织中 BDNF 的表达呈现逐渐增高的趋势, 但均较对照组偏低。推测应激刺激后 BDNF 的表达并不是单一的下降或升高, 而是存在一个动态的变化过程。

星形胶质细胞是神经系统功能活动中不可或缺的重要组成部分, 但在抑郁症的发病过程中, 关于星形胶质细胞的功能和作用, 目前的研究相对较少。利用荧光标记法显示星形胶质细胞特异性标记蛋白 GFAP, 可以在原位显示星形胶质细胞^[12]。本实验中, 采用免疫荧光双标方法检测 GFAP 和 BDNF 的表达, 结果显示给予 CUMS 应激后, 大鼠海马部分星形胶质细胞胞质内 GFAP 和 BDNF 存在共定位, 说明星形胶质细胞中有 BDNF 的合成。同时, 本实验的 Western blot 结果表明 CUMS 后大鼠 1、7、14 d 海马组织中 BDNF 的蛋白表达均低于对照组, 这种降低有可能由星形胶质细胞合成分泌 BDNF 降低引起。但本实验未对星形胶质细胞进行单独检测和分析, 因此, 给予 CUMS 应激导致的海马组织 BDNF 降

低 在多大程度上由星形胶质细胞合成 BDNF 的变化而引起 就本实验结果看目前还不能确定。本研究结果提示给予大鼠 CUMS 后, 海马星形胶质细胞 BDNF 出现改变 有必要进行深入研究。

参考文献

- [1] Gu L, Xie J, Long J, et al. Epidemiology of major depressive disorder in mainland china: a systematic review [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65356.
- [2] Mao Q Q, Huang Z, Zhong X M, et al. Brain-derived neurotrophic factor signalling mediates the antidepressant-like effect of piperine in chronically stressed mice [J]. *Behav Brain Res*, 2014, 261: 140–5.
- [3] Teche S P, Nuernberg G L, Sordi A O, et al. Measurement methods of BDNF levels in major depression: a qualitative systematic review of clinical trials [J]. *Psychiatr Q*, 2013, 84(4): 485–97.
- [4] Akinfiresoye L, Tizabi Y. Antidepressant effects of AMPA and ketamine combination: role of hippocampal BDNF, synapsin, and mTOR [J]. *Psychopharmacology (Berl)* 2013 230(2): 291–8.
- [5] 袁 杨, 刘 昊, 王海涛, 等. 抑郁大鼠海马区微管蛋白表达的变化 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(3): 355–7, 362.
- [6] 胡晓蕊, 沈宗霖, 许秀峰. 脑源性神经营养因子与抑郁症关系的研究 [J]. *临床精神医学杂志*, 2017, 27(2): 137–9.
- [7] Wang L, Peng D, Xie B, et al. The extracellular signal-regulated kinase pathway may play an important role in mediating antidepressant-stimulated hippocampus neurogenesis in depression [J]. *Med Hypotheses*, 2012, 79(1): 87–91.
- [8] Mendez-David I, Tritschler L, Ali Z E, et al. Nrf2-signaling and BDNF: A new target for the antidepressant-like activity of chronic fluoxetine treatment in a mouse model of anxiety/depression [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 597: 121–6.
- [9] 王 建, 张印南, 许崇涛. 脑源性神经营养因子与抑郁症的关联研究进展 [J]. *汕头大学医学院学报*, 2013, 26(1): 62–4.
- [10] Naert G, Ixart G, Maurice T, et al. Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2011, 46(1): 55–66.
- [11] Nibuya M, Takahashi M, Russell D S, et al. Repeated stress increases catalytic TrkB mRNA in rat hippocampus [J]. *Neurosci Lett*, 1999, 267(2): 81–4.
- [12] 杨春蕊. 小鼠抑郁症模型建立及干预、行为学和海马 GFAP 变化研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2013.

Expression of BDNF in hippocampal astrocytes of chronic unpredictable mild stimulation rats

Wu Hongfang, Jing Qiyang, Cao Jinying, et al

(Dept of Neurology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000)

Abstract Objective To observe the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hippocampal astrocytes of rats with chronic unpredictable mild stimulation (CUMS). **Methods** 60 adult rats were randomly divided into stress group ($n=30$) and control group ($n=30$), the stress group rats were given with CUMS, and the control group were grabbed once a day. The behavior test, open field experiment and Morris water maze test were used to detect the behavior of the two groups rats. The localization of specific marker protein glial fibrillary acidic protein (GFAP) and BDNF protein in rat hippocampal astrocytes was detected by immunofluorescence double-label method. The expression level of BDNF protein in the hippocampus was detected by Western blot. **Results** ① Sugar preference experiment: the consumption of sugar water and the percentage of preference in the stress group were lower than that in the control group ($P<0.01$). ② Open field experiment: the total walk distance, the time of central activity, the number of standing and the number of modified behavior of the stress group were lower than those of the control group ($P<0.01$). ③ Morris water maze test: the average escape latency of stress group was significantly longer than that of control group ($P<0.01$). ④ GFAP and BDNF double-labeled immunofluorescence results: part of the astrocytes of cytoplasm GFAP and BDNF have co-located. ⑤ Western blot analysis showed that the expression level of BDNF in the hippocampus of the stress group was lower than that of the control group at 1 d, 7 d and 14 d after CUMS ($P<0.01$). **Conclusion** Expression of BDNF in hippocampal astrocytes of depressed rats is decreased, which may be related to the pathogenesis of depression.

Key words chronic unpredictable mild stimulation; hippocampus; astrocytes; brain-derived neurotrophic factor; rats