

天麻素对老年痴呆树鼩海马 BDNF 表达的影响

何保丽, 角建林, 李波, 李进涛, 王丽梅
(昆明医科大学实验动物学部, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 探讨天麻素对老年痴呆树鼩脑内海马 BDNF 表达的影响. **方法** 用 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 侧脑室注射建立树鼩老年痴呆模型. 从模型制作后第 8 天开始, 治疗组树鼩连续 30 d 灌胃给予天麻素. 通过 RT-PCR 检测海马脑源性神经营养因子 (BDNF) mRNA 的表达. **结果** 海马 BDNF mRNA 在天麻素治疗组的表达高于模型组 ($P < 0.05$). **结论** 天麻素能在一定程度上上调树鼩海马 BDNF 的表达.

[关键词] 树鼩; 老年痴呆; 天麻素; BDNF 表达

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2013) 09-0029-03

Effects of Gastrodin on BDNF Expression in AD Tree Shrew

HE Bao-li, JIAO Jian-lin, LI Bo, LI Jin-tao, WANG Li-mei
(Dept. of The Experimental Zoology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of gastrodin on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in Alzheimer's disease (AD) tree shrew. **Methods** AD tree shrew model was established by intracerebroventricular injection with amyloid- β peptide ($A\beta$). Since the eighth day after injection, the tree shrews were treated with gastrodin for thirty days. The expression of BDNF in tree shrew hippocampus was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The expression of BDNF mRNA in the treatment group was higher than that in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Gastrodin can increase some degree of the expression of BDNF.

[Key words] Tree shrew; Alzheimer's disease; Gastrodin; BDNF expression

老年痴呆是目前最常见的一种神经退行性疾病, 对老年痴呆的治疗研究至今尚未取得突破性进展. 据报道, 天麻素对老年痴呆树鼩的学习记忆改善起到一定作用, 但其作用的分子机制尚不清楚. 脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 在脑和脊髓中广泛存在, 对神经元的生存、生长、分化、神经损伤修复和学习记忆有重要影响, 对神经元的存活和维持正常生理功能具有积极的意义^[1,2]. 那么, 在老年痴呆的治疗中, BDNF 起到什么样的作用受到了大家的关注, 为此, 本文应用 RT-PCR 法, 研究 BDNF 在正常树鼩和痴呆树鼩海马的变化规律, 以期揭示天麻素对老年痴呆的改善作用是否与 BDNF 的表达有关提供有用的参考.

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及模型处理

拟进行实验的树鼩共分为 3 组, 即对照组 (Control), 模型组 (Model), 天麻素组. 每组 5 只, 雌雄不拘. 模型组的处理方法: 注射前将 $A\beta$ (1-40) 溶于高压后的水中, 浓度为 $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 于 37°C 恒温箱中孵育 7 d, 使其呈为聚集态, 将树鼩腹腔注射水合氯醛 (10%, 300 mg/kg) 针时间均为 5 min. 天麻素组的模型制作方法同模型组, 造模 1 周后, 给予树鼩注射天麻素进行麻醉. 用脑立体定位仪定位后, 向树鼩左侧海马缓慢注射 $A\beta$ (1-40) $1 \mu\text{L}$, 注射及留注射液, 用医用 0.9% 生理

[基金项目] 云南省高校药学重点实验室项目 (2011YXZD01)

[作者简介] 何保丽 (1978~), 女, 云南马关县人, 硕士研究生, 实验师, 主要从事人类疾病模型建立研究工作.

盐水按 60 mg/kg 剂量对树鼩进行腹腔注射, 每日 1 次, 连续 20 d, 左右腹腔交替注射. 模型组和对照组腹腔注射生理盐水.

1.2 标本采集与处理

天麻素治疗结束后, 各组动物用水合氯醛 (10%, 300 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 用焦炭酸乙二酯 (DEPC) 水对手术器械进行浸泡处理, 然后高压消毒. 用处理过的手术器械打开树鼩颅腔, 取出脑, 分离海马并取出大约 150 mg, 用 DEPC 处理水把海马上的血液冲洗干净, 处理完毕后放入预先加有 1.5 mL TRIZOL 裂解液的 EP 管中, 用匀浆器匀浆至浆液均匀且无颗粒状组织.

1.3 总 RNA 提取

海马总 RNA 用 TRIZOL 试剂盒进行提取, 提取完毕后取 1 μ L RNA 样品在紫外分光光度计中测 OD 值. RNA 的完整性采用 1.5% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测, 并在紫外线透射分析仪上观察电泳结果. 然后用 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒把 RNA 逆转录为 cDNA 模板.

1.4 RT-PCR 扩增目的基因

目的基因 BDNF 和内参 β -actin 的引物序列采用 Primer Premier 5.0 软件设计, 并送上海生物工程有限公司进行合成. 目的基因的引物序列、退火温度如下: BDNF (上游引物: 5'TCCCTGGCTGACACTTTT-3', 下游引物: 5'-ATTGGGTAGTTCGGCATT-3'), 退火温度 50 $^{\circ}$ C. β -actin (上游引物: 5'-GTAAAGAC-CTCTATGCCAACA-3, 下游引物: 5'-GGACT-CATCGTACTCCTGCT-3'), 退火温度 52 $^{\circ}$ C.

PCR 反应的体系为: 总体积 20 μ L, 2 \times PCR Master Mix 10 μ L, cDNA template 1 μ L, 上游引物 2 μ L, 下游引物 2 μ L, PCR water nucle-free 5 μ L. 震荡, 离心混匀 10 s 后, 放入 PCR 仪, 按以下反应条件进行 PCR 扩增: 预变性: 95 $^{\circ}$ C, 3min; 变性: 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 退火: 47 $^{\circ}$ C, 30 s; 延伸: 72 $^{\circ}$ C, 30 s (变性、退火、延伸三步行 38 个循环); 总延伸: 72 $^{\circ}$ C, 10 min.

PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 电泳后用 BIO-RAD 凝胶成像系统成像, 用 ImageJ 软件计算各个样本 PCR 产物电泳条带光密度值, 所得光密度值与 β -actin 条带光密度值的比值为相对光密度值.

1.5 统计分析

实验所得数据用 SAS 统计软件进行统计分析, 各组间 BDNF mRNA 的表达用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

天麻素对脑组织 BDNF mRNA 表达的影响见图 1, 各组均能检测到 BDNF mRNA 的表达, 条带 1 为模型组, 其带最暗; 条带 2 为对照组, 其带比模型组更亮; 条带 3 为天麻素组, 其条带最亮. 模型组 BDNF mRNA 的表达低于对照组 ($P < 0.05$); 天麻素组的 BDNF mRNA 表达高于模型组, 但与对照组相比差异无统计学意义, 见表 1.

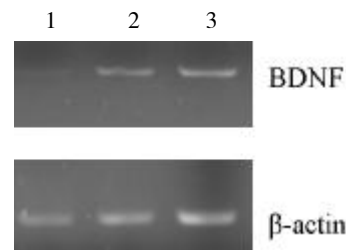


图 1 海马 BDNF 和 β -actin 的 RT-PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 RT-PCR amplification of BDNF in hippocampus

1: 模型组; 2: 对照组; 3: 天麻素组.

表 1 平均光密度比值单因素方差分析 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Factor analysis of variance of mean grayscale value ($\bar{x} \pm s$)

组别	光密度比值
对照组	1.34 \pm 0.15*
模型组	0.98 \pm 0.12
天麻素组	1.41 \pm 0.19*

与模型组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

脑源性神经营养因子 (BDNF) 是神经营养因子家族的重要成员, BDNF 与神经细胞的生长、发育、分化及功能维持有着密切关系, 并对受损的神经细胞具有保护作用^[3-5]. 有实验证实, 啮齿类动物脑中 BDNF mRNA 具有较高的表达量, 全脑的表达水平为 0.68 pg/mg. 已有研究证实, 在小鼠中枢神经系统中海马的 BDNF mRNA 最高^[6,7]. BDNF 与学习记忆的关系是目前研究人员关注的热点, Ma 等^[8]采用被动回避行为测试, 发现表现良好的大鼠训练 1、3、6 h 后, 其齿状回 BDNF mRNA 水平较行为测试中表现较差组明显提高, 将 BDNF 反义寡核苷酸直接注入海马齿状回后, 大鼠的记忆

(下转第 37 页)