

## 大鼠脊髓全横断后相关部位的 BDNF 表达

王昭君, 刘 佳, 习杨彦彬, 郝春光, 戴 萍, 王廷华  
(昆明医学院神经科学研究所, 云南昆明 650031)

**[摘要]** **目的** 探讨大鼠脊髓全横断损伤后相关部位(大脑皮质、横断脊髓上端、下端和比目鱼肌)脑源性神经营养因子(BDNF) mRNA 的表达变化. **方法** 首先建立正常对照组和实验组模型, 其中实验组又依照大鼠全横断脊髓损伤术后 1、3、7、14 d 不同观察时间点分为 4 个亚组, 分别抽提横断脊髓上端及其相连的大脑皮质、横断脊髓下端和比目鱼肌组织中总 RNA, 用 RT-PCR 技术检测 BDNF mRNA 的表达, 以  $\beta$ -actin 为参照确定各时相 BDNF mRNA 的相对水平. **结果** (1) 大鼠脊髓全横断损伤后, BDNF mRNA 在大脑皮质、脊髓横断上、下端和肌肉中均有表达, 且在正常对照组中大脑皮质的 BDNF mRNA 表达少于脊髓横断上、下端 ( $P < 0.05$ ); (2) 手术后 14 d 时肌肉组织中 BDNF mRNA 的表达较手术后 1 d 和 3 d 组均有明显增加 ( $P < 0.05$ ), 说明大鼠脊髓全横断损伤 14 d 时, 脊髓下端相连的骨骼肌组织中的 BDNF mRNA 表达上调. **结论** BDNF 在骨骼肌表达增加, 提示 BDNF 可能参与维持骨骼肌的功能, 或者转运入脊髓下端对下位运动神经元发挥营养作用.

**[关键词]** 脊髓损伤; BDNF mRNA; RT-PCR; 大鼠

**[中图分类号]** R322.81 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2007) 06-0058-04

## The Changes on BDNF Expression in Transected Spinal Cord, Associated Motor Cortex and Skeleton Muscle Following Spinal Cord Injury in Rats

WANG Zhao-jun, LIU Jia, XIYANG Yan-bin, HAO Chun-guang, DAI Ping, WANG Ting-hua  
(Institute of Neuroscience, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the changes on BDNF mRNA in transected spinal cord and associated motor cortex and skeleton muscle following cord injury in rats. **Methods** 20 adult Sprague Dawleys rats were performed spinal cord transected operation at T11 level, then rats in each group ( $n = 5$ ) were sacrificed on 1, 3, 7 and 14 days post operation respectively. Other 5 rats were used as normal control without operation. The tissues from the rostral, caudal segments near injury site, cerebral cortex and linea obliqua tibiae were harvested. Total RNA was extracted with Trizol reagent separately. The BDNF mRNA expression in each group was detected by RT-PCR. **Results** (1) BDNF positive bands were seen in the tissues of the rostral, caudal segments near injury site, cerebral cortex and linea obliqua tibiae. Moreover, BDNF level in cerebral cortex is more than in the spinal cord at normal control ( $P < 0.05$ ). (2) BDNF expression in 14 days post operation significantly increased in the tissue of linea obliqua tibiae, compared with that of 1 days post operation and 3 days post operation groups ( $P < 0.05$ ). However, there was no significant difference on BDNF expression among other groups. **Conclusions** BDNF mRNA expression is detected in transected spinal cord injury and associated tissues, which indicate that BDNF might be related to the physiological function in rat spinal cord and associated tissues. However, following spinal cord transected injury, BDNF expression increases only in muscular tissue at 14 days

**[作者简介]** 王昭君 (1981~), 女, 山西人, 在读硕士研究生, 主要从事神经生物学脊髓损伤与修复的研究.

**[通讯作者]** 王廷华. E-mail: [tinghua\\_neuron@263.net](mailto:tinghua_neuron@263.net)

post operation, which indicate that BDNF may be involved in either the control of muscular activity or the function of in spinal motor neurons by transport mechanism.

[Key words] Spinal cord injury; BDNF mRNA; RT-PCR; Rat

传统观点认为, 哺乳动物的脑和脊髓损伤后不能再生. 直到 1958 年, Liu 和 Chambers<sup>[1]</sup>首次证实哺乳动物的中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 损伤后仍有一定的修复能力<sup>[2]</sup>. 近年来研究发现, 支持神经元突起再生的微环境发生改变, 对于神经损伤修复和功能恢复有着重要意义. 脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 是德国神经生物学家 Barde<sup>[3]</sup>等于 1982 年从猪脑中分离出来的小分子碱性蛋白质. BDNF 被认为是运动神经元存活的重要因子, 对大鼠脊髓全横断损伤 (spinal cord injury, SCI) 可塑性都具有非常重要的意义. 本研究采用 RT-PCR 方法观察在脊髓全横断成年大鼠模型中 BDNF mRNA 在横断脊髓上端和其相连的大脑皮质、脊髓下端和比目鱼肌中的表达变化情况, 为了解 BDNF 与脊髓损伤的关系提供实验依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物模型制作及分组

健康雌性成年 SD 大鼠 25 只 (昆明医学院动物科提供), 体重 200~220 g. 随机分为 2 组: 正常对照组, 不进行任何手术处理; 实验组, 用 3.6% 水合氯醛 (1 mL/100 g) 腹腔注射麻醉, 以 T<sub>11</sub> 棘突为中心约 2 cm 处行椎板切除术, 然后依次缝合皮下组织和皮肤. 术后饲养 1、3、7、14 d 处死取材, 依照术后 1、3、7、14 d 不同观察时间点分为 4 个亚组. 每组 5 只.

### 1.2 RT-PCR 扩增目的基因

引物设计与合成: 从基因库里查找内参  $\beta$ -actin 和 BDNF 的 mRNA 的序列, 利用 primer premier 5 引物设计软件设计引物, 由大连宝生物工程公司合成, 如下:  $\beta$ -actin: Sense 5' -GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3' Antisense 5' GGACTCATCGTACTCCTGCT-3'; BDNF: Sense 5' ATTGGGTAGTTCGGCATT-3'. 其 PCR 扩增产物分别为 227 bp 和 466 bp.

总 RNA 的提取及检测: 取 100 mg 脊髓组织, 用 TRIZOL 试剂盒提取总 RNA, 1.5% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 紫外线透射分析仪上观察电泳结果. 取 1  $\mu$ L RNA 样品在紫外分光光度仪中测其浓度.

逆转录 cDNA 第一条链的合成: 按照逆转录试剂盒 (#K1622, Fermentas) 说明合成 cDNA. RNA 样品均取 4  $\mu$ g, 合成的 cDNA 第一条链可直接用于 PCR 扩增反应.

聚合酶链式反应 (PCR): 按照 2  $\times$  PCR Master Mix Kit (#K0171, Fermentas) 试剂盒说明书操作. 向 0.5 mL PCR 管中顺序加入 2  $\times$  PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L, PCR water nuclease-free 10.5  $\mu$ L, BDNF 上游引物 0.5  $\mu$ L, BDNF 下游引物 0.5  $\mu$ L, Template cDNA 1  $\mu$ L. PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 总延伸 10 min. 同样的方法来扩增内参管家基因  $\beta$ -actin (退火温度 52  $^{\circ}$ C).

### 1.3 1% 琼脂糖凝胶电泳、BIO-GEL 凝胶成像及灰度分析

1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 在 BIO-GEL 凝胶成像仪紫外模式下拍摄凝胶图片, 并用 BIO-GEL 凝胶分析系统测定各目的基因条带的灰度值, 分析计算目的条带与  $\beta$ -actin 灰度的比值.

### 1.4 统计学处理

各组数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 SPSS 11.0 统计软件包进行单因素方差分析, 组间的多重比较使用 *t* 检验; 以  $P < 0.05$  为有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性

RNA 样品经 1.5% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 可见 28S、18S 条带, 说明所提取 RNA 样品完整, 可以用于逆转录, 见图 1.

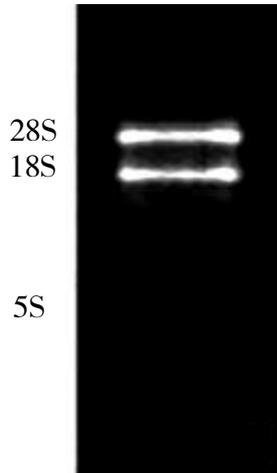


图 1 RNA 样品的 1.5% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳图  
Fig.1 1.5% Formaldehyde degeneration agarose gel electrophoresis straps of RNA templates

## 2.2 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的结果

在各分组及各组织中均有  $\beta$ -actin 和衰老相关基因的表达, 得到目的基因片段, 与预期的片段长度一致, 见图 2。

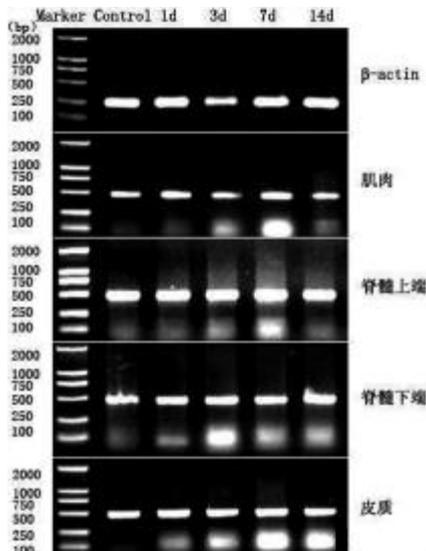


图 2 BDNF 的 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳图  
Fig.2 1% agarose gel electrophoresis figures of  $\beta$ -actin and BDNF PCR productions

## 2.3 图片灰度扫描结果

对图片进行灰度扫描, 数据校正后求出与

$\beta$ -actin 的比值, 将各组间进行方差分析. 结果显示: (1) 大鼠脊髓全横断损伤后, BDNF mRNA 在大脑皮质、脊髓横断上、下端和肌肉中均有表达, 且在正常对照组中大脑皮质的 BDNF mRNA 表达少于脊髓横断上、下端 ( $P < 0.05$ ); (2) 手术后, 仅 14 d 时肌肉组织中 BDNF mRNA 的表达较手术后 1 d 和 3 d 组均有明显增加 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

## 3 讨论

BDNF 作为一种重要的 NTFs, 其生物学效应十分广泛. 它不仅是神经元生长、分化和发育阶段的一种至关重要的因子, 而且对维持成熟神经元的存活、分化及生理功能起着关键的作用, 并能促进 SCI 后皮质脊髓神经元的连接<sup>[4]</sup>. 发育中脊髓和成年脊髓损伤后, BDNF 及其 mRNA 的表达均较损伤前明显增加<sup>[5]</sup>. Dougherty 等<sup>[6]</sup>应用双重免疫标记法发现, SCI 后损伤脊髓局部 BDNF 免疫反应阳性星形胶质细胞和小胶质/巨噬细胞数显著增加; 此外, 人类胚胎干细胞衍生的少突胶质祖细胞在 SCI 后 BDNF 的表达增加<sup>[7]</sup>. SCI 后 BDNF 及其 mRNA 在胶质细胞中的表达增加可能与胶质细胞通过产生 BDNF 等 NTFs 进而参与脊髓损伤修复有关. 说明 BDNF 不仅参与了脊髓发育而且可能与脊髓损伤修复有关。

在本实验中, 各组大鼠的大脑皮质、横断脊髓上端、下端和比目鱼肌中均能检测到 BDNF mRNA, 说明 BDNF 参与了脊髓损伤的修复过程, 是脊髓损伤修复必需的依赖因子. 并且, 正常生理情况下大脑皮质表达的 BDNF mRNA 少于脊髓横断上、下端. 然而, SCI 后大脑皮质、脊髓横断部位上、下端 BDNF mRNA 表达随时间延长增加不显著, 提示 BDNF 的基因表达无明显变化, 表明脊髓损伤后内源性 BDNF 的合成可能并未启动. 提示损伤脊髓若需 BDNF, 更多可能是靠转运方式. 有文献报道, 成年脊髓后角内仅见 BDNF, 而无 BDNF mRNA<sup>[8]</sup>, 而最初的 BDNF 主要由背根节转运而来<sup>[9]</sup>.

有趣的是, 本研究同时发现, 大鼠脊髓全横断后, 仅 14 d 时发现 BDNF mRNA 在肌肉组织中

表1 大鼠脊髓全横断后相关部位的 BDNF 表达 ( $\bar{x} \pm s$ , OD 值)Tab.1 Expressions of BDNF in different tissues following spinal cord injury in rats ( $\bar{x} \pm s$ , OD value)

部 位	正常对照组	实 验 组			
		手术 1 d	手术 3 d	手术 7 d	手术 14 d
肌肉	0.44 ± 0.20	0.92 ± 0.88	0.58 ± 0.14	0.46 ± 0.12	0.32 ± 0.09 <sup>ab</sup>
脊髓横断上端	0.70 ± 0.33	0.59 ± 0.13	0.65 ± 0.15	0.76 ± 0.23	0.71 ± 0.41
脊髓横断下端	0.73 ± 0.16	0.64 ± 0.14	0.71 ± 0.17	0.63 ± 0.15	0.98 ± 0.94
大脑皮质	0.54 ± 0.05 <sup>cc</sup>	0.55 ± 0.21	0.51 ± 0.11	0.47 ± 0.02 <sup>de</sup>	0.41 ± 0.13

与手术 1 d 比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与手术 3 d 比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与肌肉比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与脊髓横断上端比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与脊髓横断下端比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$ .  $n = 5$ .

的表达增加. BDNF 在脊髓横断处所支配的靶组织—肌肉组织表达上调, 说明, BDNF 可能涉及肌肉活性的维持或可能通过各种作用模式运输到横断脊髓来发挥其生物学效应. 神经营养因子是由靶细胞合成并经神经突起逆行转运至神经元胞体而发挥作用的小分子蛋白质, 其作用模式主要有 3 种: 靶源性作用方式、旁分泌和自分泌. 旁分泌和自分泌可能促进神经元的分化与存活, 在损伤和应激状态下作用更强, 因为它们更近, 容易发挥作用<sup>[10]</sup>. 生理情况下, 周围靶分泌和旁分泌产生的脑源性神经营养因子通过逆轴索运输到达神经元胞体. 与神经元自分泌产生的脑源性神经营养因子一起激活一系列细胞内信号传递系统以维持神经元正常的生理活动. 如果神经受到损伤和轴索断裂, BDNF 的逆向运输中断, 那么神经元会发生死亡、轴索再生也随之消失<sup>[11]</sup>. 由于 BDNF 在神经损伤时具有维持神经元的结构, 促进神经生长与修复作用, 因此, 我们推测肌肉组织中上调表达的 BDNF 可能逆行运输到脊髓损伤处进而发挥其对脊髓损伤后的修复作用. 此外, 全横断损伤后 14 d 组模型的肌肉组织中 BDNF mRNA 表达较手术 1 d 组和 3 d 组显著增加, 这可能是由于脊髓损伤后的早期, 骨骼肌的运动明显减少, BDNF 作为 1 种活动依赖因子, 其表达必然受到影响; 同时由于神经修复的需要, 骨骼肌中的 BDNF 可能逆行转运急剧增加<sup>[12]</sup>; 随着大鼠后肢功能的恢复, 运动有所增加, BDNF 的表达在 14 d 时出现了增加, 从而提示 BDNF 是“活动依赖”因子, 其表达上调对维持肌肉的功能可能有重要作用.

## [参考文献]

- [1] LIU C N, CHAMBERS W W. Intraspinal sprouting of dorsal root axons; development of new collaterals and preterminals following partial denervation of the spinal cord in the cat [J]. *Am Arch Neurol Psychiatry*, 1958, 79 (1): 46–61
- [2] KODA M, HASHIMOTO M, MURAKAMI M, et al. Adenovirus vector – mediated in vivo gene transfer of brain – derived neurotrophic factor (BDNF) promotes rubrospinal axonal regeneration and functional recovery after complete transection of the adult rat spinal cord [J]. *J Neurotrauma*, 2004, 21 (3): 329–337
- [3] BARDE YA, EDGER D, THOENEN H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain [J]. *EMBO J*, 1982, 1 (5): 549–553
- [4] VAVREK R, GIRFIS J, TETZLAFF W, et al. BDNF promotes connections of corticospinal neurons onto spared descending interneurons in spinal cord injured rats [J]. *Brain*, 2006, 129 (6): 1534–1545
- [5] NAKAMURA M, BREGMAN S. Differences in neurotrophic factor gene expression profiles between neonate and adult rat spinal cord after injury [J]. *Exp Neurol*, 2001, 169 (2): 407–415
- [6] DOUGHERTY K D, DREYFUS C F, BLACK I B. Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes; and microglia / macrophages after spinal cord injury [J]. *Neurobiol Dis*, 2000, 7 (6 PtB): 574–585

(下转第 98 页)

参数造成的病变深达 0.8 mm, 达到兔皮层的 2/3, 已能有效地破坏兔皮层 I~III 层的水平纤维, 从而阻断了癫痫的同步化放电, 达到了治疗的目的。

癫痫发作是由兴奋性神经递质和抑制性神经递质失衡导致。Glu 是一种中枢兴奋性神经递质, 其含量升高可增强神经中枢的兴奋性<sup>[15,16,17]</sup>GABA 是中枢抑制性神经递质, 故其含量升高可增加对神经中枢的保护作用<sup>[15,18]</sup>。海马区神经递质的变化可直接反映大脑神经细胞分泌各种神经递质<sup>[15]</sup>。我们实验中发现 S 组海马区 GABA 和 Glu 含量在各时间段基本无变化。HP 组 GABA 在各时间段逐渐增加, 而 Glu 含量逐渐减少, 以 2 h 改变最为明显, 与 S 组、NHP 组比较均  $P < 0.05$ , 有统计学意义。NHP 组 0 h 的 GABA 含量明显较 S 组低, 而 Glu 含量却明显高于 S 组, NHP 组在 2 h 内 GABA 和 Glu 含量变化不明显, 6 h 和 24 h GABA 有所上升, Glu 略有下降。结果提示, 65 °C 生理盐水局部灌注皮层能够抑制癫痫发作, 其作用可能与抑制 Glu 释放有关。

综上所述, 本研究证实 65 °C 生理盐水局部灌注皮层能够抑制癫痫发作, 且该温度短时间内不会对兔大脑功能造成影响。为抑制清醒手术中癫痫发作提供了一种最简单的方法。具有重要的应用前景和临床实用价值。但兔脑与人脑有很大的差异, 用高温生理盐水灌注人脑皮层抑制术中癫痫发作还需进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] DUFFAUH, CAPELLEL, SICHEZJ, et al. Intra-operative direct electrical stimulations of the central nervous system: the Salpetriere experience with 60 patients [J]. *Acta Neurochir*, 1999, 141: 1157~1167
- [2] GUMPRECHT H, EBEL G K, AUER D P, et al. Neuronavigation and functional MRI for surgery in patients with lesion in eloquent brain areas [J]. *Minim Invasive Neurosurg*, 2002, 45: 151-153
- [3] KALDMANC J. Effect of propofol etomidate, midazolam and fentanyl on motor evoked responses to transcranial electrical at magnetic stimulation in humans [J]. *Anesthesiology*, 1992, 76: 502-505
- [4] 栾国明, 张伟丽. 脑皮层热灼治疗功能区顽固性癫痫的可行性研究 [J]. *中华神经外科杂志*, 1999, 12 (3): 1-4
- [5] BENIFLAM. Multiple subpial transections in pediatric epilepsy: indications and outcomes [J]. *Childs Nerv Syst*. 2006, 22 (8): 992-998
- [6] DUNLOP PRC et al. An assessment of Local hyperthermia in clinical practice [J]. *Hyperthermia*, 1986, 2 (1) 39-43
- [7] 蒋大介. 实用神经外科手术学 [M]. 上海: 科技出版社, 1990: 224
- [8] 谭启富, 李龄, 吴承远. 癫痫外科学 [M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 588-590
- [9] 宋立群, 肖洪彬, 宋淑娟, 等. 安痢宁冲剂对青霉素诱导的大鼠癫痫模型影响的实验研究 [J]. *中国中医药科技*, 2002, 9 (3): 151-153
- [10] DEVAX B, LAMARCHE M FALLET B C, et al. Multiple conical photolesion and penicillin epileptogenic focus, study of a model in rabbit [J]. *Neurosci surgical*, 1999, 4: 80-84
- [11] ASANUMA H, SAKATA H. Functional organization of a cortical system examined with focal depth stimulation in cats [J]. *Neurophysiol*, 1967, 30: 35-54
- [12] SHIMIZU H, KAWAI K. Hippocampal transection for treatment of left temporal lobe epilepsy with preservation of verbal memory [J]. *Clin Neurosci*, 2006, 13 (3): 322-328
- [13] ZHAO Q. Evaluation of the combination of multiple subpial transection and other techniques for treatment of intractable epilepsy [J]. *Chin* 2003, 116 (7): 1004-1007
- [14] YANGZ, LUANG. Treatment of symptomatic epilepsy with lesion ectomies combined with bipolar coagulation of the surrounding cortex [J]. *Chin*, 2003, 116 (12): 1930-1932
- [15] MELDRUM B S. Neurotransmission in epilepsy [J]. *Epilepsia*, 1995, 36: 530-534
- [16] JANJUAN A, KABATO H, MORI A. Increased plasma glutamate in a genetic model of epilepsy [J]. *Neurochem Res*, 1992, 17: 293-296
- [17] LELDRUMB S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders [J]. *Neurology*, 1994, 44: 514-517
- [18] SATZINGCR G. Antiepilepsy from gamma-aminobutyric acid [J]. *Arznei-Forsch Drag Res*, 1994, 44: 261-265

(2007-09-15 收稿)