

成年恒河猴大脑皮质 BDNF 分离、鉴定及其分布

李 玉¹⁾, 王 波¹⁾, 王廷华²⁾, 刁杨彦彬²⁾

(1) 昆明医学院第一附属医院神经外科, 云南昆明 650032; 2) 昆明医学院神经科学研究所, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 分离、鉴定成年恒河猴大脑皮质 BDNF, 并探讨其组织分布. **方法** 取成年恒河猴大脑皮质组织, 匀浆制作蛋白提取液, SDS-PAGE 电泳分离, Western blot 鉴定. 进而制作猴大脑皮质冰冻切片, 用 BDNF 抗体行免疫组织化学 SP 法染色, 观察 BDNF 免疫阳性反应在成年恒河猴大脑皮质的分布, 探讨 BDNF 的生物学功能. **结果** 电泳分离后, Western blot 检测到分子量 14 kD 左右有 BDNF 特异阳性染色条带. 免疫组化染色显示猴脑皮质第 III 和第 V 层神经元胞浆和突起均有 BDNF 染色. **结论** 电泳可分离恒河猴大脑皮质多种蛋白质, 其中 BDNF 能通过 Western blot 识别鉴定; BDNF 主要定位猴脑皮质神经元, 提示其在灵长类皮质神经元功能维持中的重要作用.

[关键词] 恒河猴; 大脑皮质; Western blot; BDNF; 组织分布

[中图分类号] R651 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2011) 01 - 0026 - 04

Isolation and Identification of BDNF in Cortex of Adult Rhesus Monkey and Its Distribution

LI Yu¹⁾, WANG Bo¹⁾, WANG Ting-hua²⁾, XIYANG Yan-bin²⁾

(1) Dept. of Neurosurgery, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 2) Institute of Neuroscience, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To isolate and identify brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the cerebral cortex of adult Rhesus monkey, and investigate its histological distribution. **Methods** The cortex tissues of monkeys were harvested, homogenized and isolated by SDS PAGE electrophoresis, and identified by western blot using rabbit BDNF specific antibody. Then the frozen sections from cortex were prepared, and the immunohistochemistry method was used to detect the distribution of BDNF in the cerebral cortex of adult Rhesus monkey. The biological function of BDNF was discussed. **Results** After electrophoresis, Western blot showed that a specific band for BDNF located in 14KD molecule weight was recognized from the homogenization of monkey cortex. The BDNF immunopositive reaction was seen in the plasma and neurite of neurons in the layer III and V cerebral cortex of monkey. **Conclusions** Electrophoresis can isolate many proteins from the cerebral cortex of Rhesus monkey. BDNF can be recognized and indentified by Western blot. BDNF is localized in the neurons of the cerebral cortex of monkey, suggestsing that BDNF may be a crucial molecule in the functional maintainence of CNS in adult monkeys.

[Key words] Rhesus monkey; Cerebral cortex; Western blot; BDNF; Histological distribution

[基金项目] 美国纽约中华医学基金资助项目 (CMB-00-72)

[作者简介] 李玉 (1965~), 男, 云南昆明市人, 医学硕士, 副教授, 主要从事癫痫外科和功能神经外科临床研究
工作.

[通讯作者] 刁杨彦彬. E-mail:xiyang_neuro@126.net

脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是 1982 年 Barde 等从猪脑中分离出的一种小分子蛋白质, 根据其来源及神经营养作用得名^[1]. BDNF 具有广泛的生物学作用, 其功能涉及维持中枢和外周多种神经元的发育和损伤修复^[2-5], 是神经组织内一种非常重要的多肽蛋白. 由于成熟 BDNF 分子量只有 14 kD, 加之其组织含量较低, 因此一般只能用 Elisa 方法来检测其组织含量, 而 Western 检测组织内 BDNF 含量的难度较大, 值得探讨.

恒河猴是人类的近亲, 在生理机能、生化代谢和形态结构方面同人类非常相似^[6]. 应用恒河猴进行实验研究, 对了解人类疾病的发生和干预机制有重要的科学价值. 然而, 目前针对研究灵长类动物的特异抗体较少, 大多数学者用鼠或者兔源性抗体对灵长类组织样本进行染色, 特异性不高. 根据抗原种属特异性的理论, 要进行猴类组化染色时, 首先需要用 Western 技术检测其它种属来源的抗体是否能特异识别猴组织样本. 本实验中, 基于 BDNF 在神经损伤修复中的重要作用^[7-10]和成年恒河猴大脑皮质 BDNF 表达检测有较大难度, 笔者对成年恒河猴大脑皮质 BDNF 进行分离与鉴定, 探讨其脑内分布, 为了解 BDNF 在灵长类神经元的作用提供实验依据.

1 材料与方 法

1.1 恒河猴大脑皮质样本获取, 提取液制备

正常恒河猴, 氯胺酮麻醉后, 取大脑皮质 100 g, 加蛋白提取液 (0.1M Triscl PH7.4 5 mL, NaCl 87.8 mg, 30% Triton-X100 0.33 mL, 10% SDS 0.1 mL 加蒸馏水至 10 mL) 1 mL, PMSF (0.1 g PMSF, 异丙醇 1 mL) 10 μ L 冰浴中匀浆至蛋白完全匀碎. 4 $^{\circ}$ C 离心 (12 000 r/min) 30 min, 取上清液, 分装 -80 $^{\circ}$ C 保存备用.

1.2 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

取皮质样本, SDS-PAGE 分离. 分离胶浓度为 12% (3.3 mL 蒸馏水, 4.0 mL 30% 丙烯酰胺存储液, 2.5 mL 1.5 Mtris, 0.1 mL 10% SDS, 0.1 mL 过硫酸铵 (使用前新鲜配制), 0.065 mL TEMED); 浓缩胶浓度 5% (2.85 mL 蒸馏水, 0.85 mL 30% 丙烯酰胺存储液, 1.3 mL 0.5 M Tris, 0.1 mL 10% SDS, 0.03 mL 过硫酸铵, 0.005 mL

TEMED); 4 $^{\circ}$ C 预冷电极缓冲液为 PH 8.3 的 Tris 甘氨酸液 (甘氨酸 14.4 g, Tris 3.03 g, 10% SDS 10 mL, 加蒸馏水至 1 000 mL). 每个样品槽点样 20 μ L. 在电泳仪控制下进行电泳, 选定电压为 120 V, 时间 90 min. 一块胶用考马斯亮蓝染色 30 min 后再脱色, 至条带清楚为止. 其余胶用于转膜进行 Western blot 实验.

1.3 免疫印迹试验

根据考马斯亮蓝染色情况, 选择相应范围的凝胶进行转膜. 剪取相应大小硝酸纤维素膜及滤纸与胶一起浸泡在转移液 (甘氨酸 14.4 g, Tris 2.42 g, 甲醇 200 mL, 加蒸馏水至 1 000 mL) 中 15 min, 按黑板 (负极), 海绵, 滤纸, 胶, 膜, 滤纸, 海绵, 白板 (正极) 依次放好, 用圆筒挤出泡沫. 选 24 伏电压 435 min 冰水浴中转膜. 丽春红染色可见清楚的条带包括 Mark. 标记 Mark 位置并剪一角作为上端标志. 分别剪取三条带宽度准备作杂交, 共四块. 袋装封闭液 (0.5 g 蛋白干粉, 10 mL 0.02 M PBST) 封闭过夜. 用 0.02 M PBST 振荡漂洗硝酸纤维素膜 5 min/L 次, 共 3 次. 分别置各组膜上加 BDNF 兔一抗, (Santa Cruz, 1:200), 袋装后挤出气泡置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜. 再次漂洗用 0.02 M PBS, 5 min/1 次, 共 3 次. 分别加羊抗兔 IgG, (1:400) 置于 37 $^{\circ}$ C 温箱, 时间 1 h 孵育. 用 0.02 M PBS 振荡漂洗硝酸纤维素膜 5 min/ 次, 共 3 次. DAB 显色 (4 mL 蒸馏水, DAB 液 4 滴, 4 μ L 30% H₂O₂). 与 Mark 相对比观察有无 BDNF 抗体特异杂交带, 根据反应强弱记录杂交带的染色强度.

1.4 免疫组织化学染色

按 SP 两步法行常规免疫组织化学染色: 0.01 M PBS 液漂洗切片 5 min、3 次; 3% H₂O₂ 处理 30 min (室温); 0.01 M PBS 液漂洗 5 min、3 次; 5% 羊血清湿盒 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 加兔抗 BDNF 抗体 (1:500), 4 $^{\circ}$ C 冰箱湿盒孵育过夜; 0.01 M PBST 液漂洗 5 min、3 次; PV-9000 试剂 1 (聚合物辅助剂) 湿盒 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 0.01 M PBST 液漂洗 5 min、3 次; PV-9000 试剂 2 (辣根酶标记的同源二抗——山羊抗兔 IgG 多聚体) 湿盒 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 0.01M PBST 液漂洗 5 min、5 次; 加取 DAB 显色剂显色 5 min; 加取单蒸水漂洗 2 遍, 终止显色; 裱片; 浓度梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片. 在光学显微镜

下, 观察免疫阳性反应物在脑组织中的分布和表达情况.

2 结果

2.1 SDS-PAGE

考马斯亮蓝染色显示, 大脑皮质电泳图谱显示 20 余条蛋白带 (见图 1). 在 66.2 kD 到 43 kD 之间有六条带较清除. 20 kD 到 14.4 kD 有两条带, 14.4 kD 以下有一条带.

2.2 各电泳条带相对迁移率及其分子量分析

根据标准蛋白分子量与其迁移率成比例的关系, 可根据 SDS-PAGE 胶上各蛋白的相对迁移率测定其分子量. 根据已知标准蛋白的分子量绘制出标准曲线, 差找出各带相对迁移率 Rf 位置分别是 0.2, 0.23, 0.27, 0.32, 0.33, 0.36, 0.42, 0.48, 0.76, 0.84, 0.95. 根据相对迁移率可求出 Rf 位置 0.76, 0.84, 0.95 三条带的蛋白分子量分别为 18 kD, 16 kD, 14 kD, 见图 1.

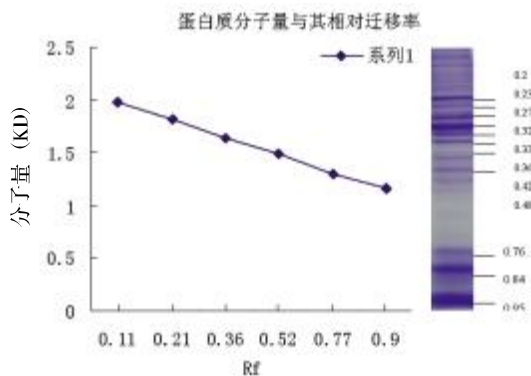


图 1 考马斯亮蓝染色现出多条蛋白, 根据标准曲线确定各蛋白分子量

Fig. 1 Several protein bands showed in the gel stained with Coomassie brilliant blue staining, which underlines the standard curve for determination of molecular weights of each protein

2.3 免疫印迹结果

转膜后用丽春红染色检测凝胶上的蛋白是否已成功转移至硝酸纤维膜, 硝酸纤维膜结果显示有多条条带 (见图 2A). 用 BDNF 抗体孵育, DAB 显色后, 在分子量大约 14 kD 的位置有一明显的阳性条带 (见图 2B). 这与考马斯亮蓝染色胶上相应位置的条带对比 (见图 2C), 可确定 BDNF 杂交带的位置.

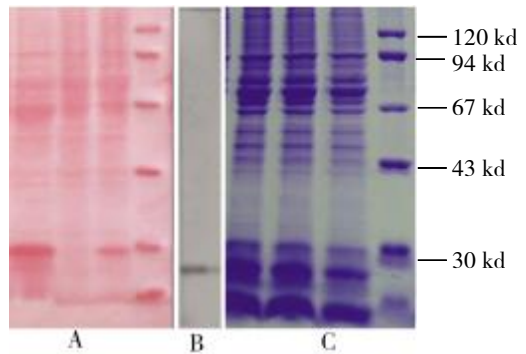


图 2 BDNF 免疫印迹

Fig. 2 Western blot of BDNF

A: 转膜后用丽春红染色; B: Western 杂交在分子量大约 14 kD 的位置有一明显的阳性条带; C: 考马斯亮蓝染色胶上相应位置有电泳带.

2.4 BDNF 在猴脑皮质的分布

光学显微镜下, 猴脑皮质分子层没有见到阳性染色, 而第 III 和第 V 层的大细胞见到明显 BDNF 染色, 这些细胞从形态看主要是神经元, 胞浆和突起均有染色, 胞核不着色 (见图 3).

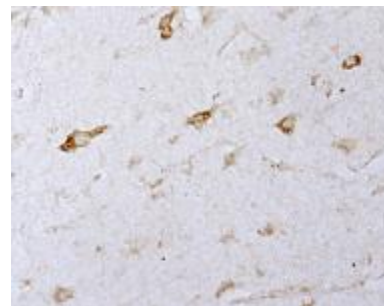


图 3 猴脑皮质第 V 层椎体细胞 BDNF 阳性染色

Fig. 3 BDNF positive products were exhibited in the cell of layer V in the cortex of monkey

3 讨论

笔者通过 SDS-PAGE 电泳与免疫印迹对正常恒河猴大脑皮质内的蛋白质进行分离鉴定, 结果发现至少有 20 余条带, 表明大脑皮质内含有的蛋白较多. 免疫印迹显示皮质内有 BDNF 表达.

目前, 市场上没有针对猴类染色的抗体. 实验中可用针对人或者鼠类抗体对猴组织样本进行染色, 但是不一定是特异染色. 因此, 常常需要用 Western 杂交先检测现有抗体是否能特异识别待检猴类样本. 只有在 Western 检测确定抗体特

异性识别组织样本后, 免疫组织化学定位蛋白分布才有可靠性.

本实验中, 笔者用电泳技术分离猴脑组织蛋白, 经 Western blot 杂交鉴定后, 用 BDNF 抗体行免疫组织化学 SP 法染色, 证明兔抗 BDNF 抗体能特异识别猴组织样本. BDNF 免疫物质主要分布在猴脑皮质第 III 和第 V 层神经元, 胞浆和突起均有阳性染色. 提示 BDNF 可能是灵长类皮质神经元功能维持的重要分子.

BDNF 是从猪脑中提起的一种小分子碱性蛋白质, 可支持来源于神经嵴^[2]、外胚层基板^[2]的神经元存活, BDNF 还促进胆碱能神经元存活^[3]. 此外, BDNF 还可营救损伤的脊髓运动神经元^[5]. 因此 BDNF 对正常神经组织细胞功能维持, 甚至损伤修复都是一个重要分子. 本实验为研究灵长类脑内 BDNF 的功能提供了重要的实验支持.

[参考文献]

- [1] RONALD M, VINDSA Y. Placode and neural crest-derived sensory neurons are responsive at early developmental stages to BDNF [J]. *Dev Bio*, 1985, 112: 319 - 328.
- [2] THOEN H. The changing scene of neurotrophic factors [J]. *TINS*, 1991, 14(5): 165 - 170.
- [3] HOFER M M, BARD Y-A. BDNF prevent neuronal death in vivo [J]. *Nature*, 1988, 331: 261.
- [4] KNUSEL B, WINSLOW J W, et al. Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by BDNF but not neurotrophin [J]. *Neurobiol*, 1991, 88: 96.
- [5] QIAO YAN, ELLIOT J, SNIDER W D. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy induced cell death [J]. *Nature*, 1992, 360: 24 - 31.
- [6] PRIVAT A, RIBOTTA M G, ORSAL D. What is a functional recovery after spinal cord injury [J]. *Nat Med*, 2000, 6(4): 358.
- [7] LOJOVICH J M. The relationship between aerobic exercise and cognition: is movement medicinal [J]. *J Head Trauma Rehabil*, 2010, 25(3): 184 - 192.
- [8] CLOW C, JASMIN B J. Brain-derived neurotrophic factor regulates satellite cell differentiation and skeletal muscle regeneration [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21 (13): 2182 - 2190.
- [9] LIU L, ZHANG X, WANG L, et al. The neuroprotective effects of Tanshinone IIA are associated with induced nuclear translocation of TORC1 and upregulated expression of TORC1, pCREB and BDNF in the acute stage of ischemic stroke [J]. *Brain Res Bull*, 2010, 31: 82(3-4): 228 - 233.
- [10] FU Q L, HU B, LI X, et al. LINGO-1 negatively regulates TrkB phosphorylation after ocular hypertension [J]. *Eur J Neurosci*, 2010, 31(6): 1091 - 1097.
- [11] REZAEI F, RELICK S L, PIEDIMONTE G, et al. Neurotrophins regulate bone marrow stromal cell IL-6 expression through the MAPK pathway [J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): 9690.
- [12] RONALD M, VINDSA Y. Placode and neural crest-derived sensory neurons are responsive at early developmental stages to BDNF [J]. *Dev Bio*, 1985, 112: 319 - 328.

(2010 - 11 - 27 收稿)