

脑缺血肺损伤大鼠肺组织中脑源性神经营养因子的表达变化*

但齐琴¹, 戴萍¹, 王盛兰², 李劲涛³, 张云辉^{2△}

1. 四川大学华西医院 转化神经科学研究中心(成都 610041); 2. 昆明理工大学附属昆华医院·
云南省第一人民医院 呼吸内科(昆明 650032); 3. 昆明医科大学 神经科学研究所(昆明 650031)

【摘要】 目的 研究脑缺血肺损伤大鼠肺组织中脑源性神经营养因子(BDNF)基因的表达变化,探讨 BDNF 的生物学作用。方法 成年 SD 大鼠 46 只,随机分为假手术组和脑缺血肺损伤组,每组 23 只,其中 5 只用于神经行为评价和肺水肿测定,用 HE 染色观察肺病理学炎症反应;每组 8 只动物用于 RT-PCR 检测肺组织 BDNF mRNA 含量变化;5 只用 ELISA 检测肺组织 BDNF 蛋白含量变化;5 只动物取肺组织进行免疫组化染色观察 BDNF 在肺的分布。结果 脑缺血后 3 d 大鼠神经功能明显受损,肺组织明显充血,水肿,大量炎性细胞浸润。BDNF mRNA 表达较假手术组高($P < 0.05$),BDNF 蛋白水平亦高于假手术组($P < 0.05$)。BDNF 免疫阳性产物定位于肺上皮和平滑肌细胞。结论 脑缺血大鼠有明显肺水肿,肺组织 BDNF 表达上调,提示 BDNF 与脑缺血肺水肿有关。

【关键词】 大鼠 脑缺血肺损伤 脑源性神经营养因子

Expression Changes of BDNF in Lung of Rats Subjected to Brain Ischemia DAN Qi-qin¹, DAI Ping¹, WANG Sheng-lan², LI Jin-tao³, ZHANG Yun-hui^{2△}. *Translational Neuroscience Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Respiration, Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Science and Technology University, Kunming 650032, China; 3. Institute of Neuroscience, Kunming Medical University, Kunming 650031, China*

△ Corresponding author, E-mail: yunhuizhang3188@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in lung injury induced by brain ischemia in rats. **Methods** 46 adult SD rats were assigned randomly to sham operation group and brain ischemia lung injury group (BIL, $n = 23$ in each group). Rats were subjected brain ischemia and allowed to survived 3 d. After performed neurological functional severe deficit evaluation, lung edema was observed ($n = 5$). The BDNF expression for its mRNA and protein in lung tissues was determined by using ELISA ($n = 5$) and RT-PCR technique ($n = 8$). The localization of BDNF was also determined by immunohistochemistry ($n = 5$). **Results** After brain ischemia for 3 days, the severe neurological functional deficit and edema in lung were seen. BDNF was located in cytoplasm of smooth muscle and epithial cells in the lung. The level of BDNF mRNA (indicated by RT-PCR) and the protein level (indicated by ELISA) were all upregulated at 3 days after brain ischemia ($P < 0.05$). **Conclusion** Lung edema occurred after brain ischemia in rats is concomitant with BDNF expression, which consists of the mechanism involved lung injury induced by brain ischemia.

【Key words】 Rat Brain ischemia lung injury Brain-derived neurotrophic factor

脑缺血肺损伤是指脑缺血过程中出现的肺部损害,近年备受关注,机制不清。脑缺血不仅造成神经损害,而且引起肺部炎症,从而加重病情,致残、致死率高。开展脑缺血肺损伤机制研究,寻找有效的防控策略,有重要的科学价值和迫切的现实意义。

脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是神经营养因子家族的主要成员,与神经元存活和再生有关^[1-3]。至今,

BDNF 在神经损伤修复中的作用已经查明^[4-6],但其是否与脑缺血肺损伤有关尚不清楚。最近的研究提示,BDNF 在多种非神经组织如皮肤、平滑肌细胞、骨骼肌以及其它结构细胞表达^[7-9],说明 BDNF 作用广泛。但 BDNF 是否在神经源性肺水肿过程中发生变化尚不清楚。故本实验建立脑缺血诱导的肺损伤模型,观察肺组织中 BDNF 表达变化,为今后用 BDNF 干预脑缺血肺损伤提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物与分组

健康成年雌性 SD 大鼠 46 只,体质量为 200~

* 云南省自然科学基金(No. 2009CD199, No. 2010ZC206, No. 2011FZ272, No. 2012fb086)资助

△ 通讯作者, E-mail: yunhuizhang3188@126.com

220 g, 购于四川大学实验动物中心。随机将大鼠分为假手术组和脑缺血肺损伤术后 3 d 组(简称脑缺血肺损伤组, 根据预实验, BDNF 在脑缺血后 3 d 表达最明显)。每组 23 只动物, 其中 5 只用于神经功能评价和肺水肿检测, 5 只用于肺组织免疫组织化学染色, 5 只用于酶联免疫吸附(ELISA)实验; 8 只用于 RT-PCR。

1.2 脑缺血肺损伤模型建立

腹腔注射 3.6% 水合氯醛麻醉 SD 大鼠(1 mL/100 g), 麻醉成功后仰卧位固定于手术台上, 消毒后从颈部做正中切口, 钝性分离胸锁乳突肌与胸骨舌骨肌, 游离出左侧颈总动脉及其颈内外动脉的分支, 在近心端结扎颈总动脉, 约距此结 5 mm 处的颈总动脉打活结, 然后用眼科剪在预先准备好的两结之间开一个小口, 把线栓用小弯镊夹住送入颈总动脉, 当线栓头部进去后将近心端的线向左摆个小角度, 以使线栓进入颈内动脉, 之后再向右摆个小角度, 以使线栓能被插入脑膜中动脉并将其堵塞。插线栓时当感到有轻微阻力感时表明线栓已插入大脑中动脉, 阻断了其血流, 造成大脑中动脉供血范围的局灶性脑缺血状态。最后止血, 缝合肌层和皮肤。假手术组除未栓塞大脑中动脉外, 其余与脑缺血肺损伤组相同。建模后, 通过神经功能评分验证脑缺血是否成功, 结合肺水肿观察, 确定脑缺血诱导的肺损伤模型建立成功。

1.3 造模成功判定标准

1.3.1 神经行为学评分 造模后 1、2、3 d, 采用 Zea-Longa 4 分法对大鼠的神经功能缺损进行评分。0 分: 无神经缺损症状; 1 分: 右前肢不能完全伸直; 2 分: 向右旋转; 3 分: 行走向右侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失。1~4 分为脑缺血动物模型建立成功。

1.3.2 肺组织湿/干比值及肺系数测定 为了解脑缺血肺水肿情况, 判断脑缺血肺损伤模型的可靠性, 造模后 3 d, 心内灌注处死动物, 取两肺中的 1 个进行肺含水量测定。先吸干肺表面水分后称湿重(W), 放入 80 °C 烤箱烘烤 48 h 至水分蒸发, 再取出称干重(D)。然后按下列公式计算含水量: (湿重 - 干重)/湿重 × 100%。湿干重比值为 W/D, 肺系数为肺湿重/体质量 × 100%。

1.3.3 肺组织病理形态学观察 造模后 3 d, 冰冻切片肺组织用 HE 染色, 常规观察病理变化。

1.4 RT-PCR 检测肺组织 BDNF 基因表达^[10]

引物设计采用 Primer premier 5.0 软件, 由大

连宝生物公司制备上、下游引物。造模后 3 d, 用 3.6% 水合氯醛麻醉大鼠, 颈动脉放血处死大鼠, 取假手术组和脑缺血肺损伤组肺组织(每组 8 只大鼠)以 Trizol 法提取总 RNA, 并逆转录为 cDNA。以 β -actin 为内对照(β -actin 上游引物: 5'-GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3', 下游引物: 5'-GGACTCATCGTACTCCTGCT-3', 扩增片段长度: 227 bp), BDNF 为目的基因(上游引物: 5'-TCCCTGGCTGACACTTTT-3', 下游引物: 5'-ATTGGGTAGTTCGGCATT-3', 扩增片段长度: 466 bp)。按以下反应条件进行 PCR 扩增: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 50 °C (BDNF) 和 52.5 °C (β -actin) 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次, 72 °C 总延伸 10 min。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳 PCR 扩增产物。凝胶成像系统(BIO-RAD)检测 BDNF mRNA PCR 产物, 并计算其与 β -actin mRNA PCR 产物光密度的比值。

1.5 ELISA 检测肺组织 BDNF 蛋白水平

按照 Chemikine™ 试剂盒方法提取造模后 3 d 各组肺组织总蛋白。BCA 法测定样品浓度。总蛋白上样量为 0.2 mg。BDNF 标准测定液及样品待测液 4 °C 孵育过夜。洗板, 4 次。室温孵育 BDNF 单克隆抗体 2.5 h。洗板, 4 次。室温孵育二抗 1 h。洗板, 4 次。用反应底物溶液室温避光孵育 15 min 后加终止液。酶标仪测量 BDNF 浓度。

1.6 免疫组织化学染色检测肺 BDNF 定位^[11]

将造模后 3 d 各组肺组织置于 40 g/L 多聚甲醛固定, 30% 蔗糖过夜沉底, 冰冻切片(片厚 20 μ m), 采用 PV9000 两步法进行免疫组织化学染色: 一抗为 BDNF 兔多克隆抗体(1:1000, Chemicon), 二抗为羊抗兔 IgG (1:100, Jackson ImmunoResearch), DAB 显色液进行棕色反应显色。梯度乙醇溶液脱水、透明、封片。光学显微镜下观察免疫阳性反应物表达分布情况。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分结果

神经功能缺损评分显示, 脑缺血肺损伤组大鼠呈现明显神经功能障碍, 各时点分值均高于假手术组($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 各组肺组织 W/D、肺系数及含水量变化

脑缺血肺损伤组肺组织 W/D、肺系数、含水量均高于假手术组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 各组大鼠神经功能缺损评分比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Comparison of neurological functional deficit each group ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Group	1 d	2 d	3 d
Sham	0.5 ± 0.2	0 ± 0	0 ± 0
BILI	3.6 ± 0.7*	2.9 ± 0.5*	2.7 ± 0.5*

* $P < 0.05$, vs. sham group

表 2 各组肺组织 W/D、肺系数、含水量比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Comparison of lung wet mass/dry mass (W/D), lung coefficient and water content among groups ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Group	Lung W/D	Lung coefficient	Water content (%)
Sham	1.71 ± 0.20	0.601 ± 0.117	0.653 ± 0.109
BILI	2.98 ± 0.45*	1.011 ± 0.154*	0.821 ± 0.113*

* $P < 0.01$, vs. sham group

2.3 肺组织病理形态学 HE 染色结果

假手术组肺组织结构正常。脑缺血肺损伤组肺

组织损伤明显,肺泡壁增厚,血管内和组织间充满红细胞;大量中性粒细胞浸润,巨噬细胞增多;肺泡腔、气道有明显渗出物,肺泡隔、血管充血,水肿。

2.4 肺组织 BDNF mRNA 的表达变化

RT-PCR 结果显示,假手术组肺组织有 BDNF 基因表达。脑缺血 3 d 后肺组织 BDNF mRNA 水平较假手术组增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1)。

2.5 肺组织 BDNF 蛋白的表达变化

ELISA 分析显示,假手术组肺组织有 BDNF 蛋白表达。与之比较,脑缺血后肺损伤组织内 BDNF 蛋白水平增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。

2.6 BDNF 在肺组织定位分布

BDNF 免疫阳性棕色产物主要位于气道上皮和平滑肌(图 3A),胞浆染色。脑缺血后,肺组织气管上皮 BDNF 染色明显加深(图 3B)。

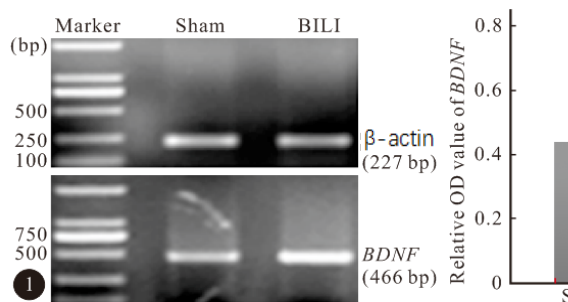


图 1 各组脑缺血肺组织 BDNF mRNA 水平变化

Fig 1 Change of BDNF mRNA in the lung of each group, indicated by RT-PCR

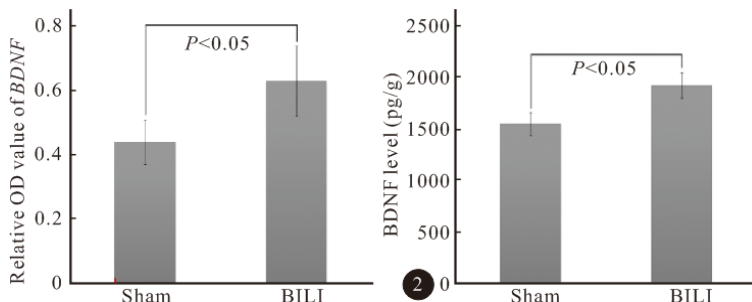


图 2 脑缺血肺组织 BDNF 蛋白水平变化(ELISA)结果

Fig 2 Chang of BDNF level in lung after brain ischemia indicated by ELISA

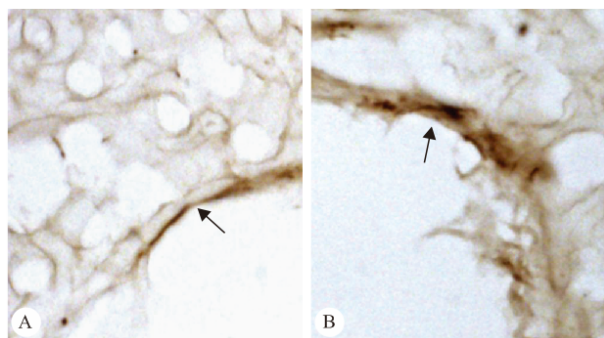


图 3 脑缺血肺气道上皮 BDNF 免疫组化染色。SP × 200

Fig 3 Immunohistochemical staining of BDNF in the airway of lung following brain ischemia. SP × 200

A: Sham group; B: BILI group

3 讨论

本实验观察到大鼠脑缺血后发生了明显的神经功能障碍,术后平均达到 2.7~3.6 分,说明脑缺血后神经功能损害明显。同时,我们观察到,脑缺血诱

导了肺部炎症损伤反应,表现为大鼠鼻腔有明显的血性泡沫,脑缺血后肺含水量明显增加,毛细血管充血,水肿,中性粒细胞和巨噬细胞浸润,说明脑缺血后肺部炎症反应明显,即脑缺血诱导的肺水肿模型建模成功。

BDNF 是一个重要的神经营养因子,不仅能维持发育中的运动神经元存活,还有利于促进损伤的运动神经元修复^[12,13]。此外,BDNF 还表达于多种非神经组织和细胞,并在非神经细胞发挥作用^[7-9]。本实验中,RT-PCR 显示 BDNF mRNA 水平在脑缺血肺组织明显增高,说明脑缺血激活了肺组织 BDNF 基因表达。ELISA 的实验结果进一步支持 BDNF 在翻译水平发生了改变。即脑缺血导致了肺组织 BDNF 蛋白水平上调。上述结果提示 BDNF 可能在脑缺血肺水肿中发挥作用。文献显示,哮喘小鼠模型中,发现气道上皮 BDNF 表达增加^[14],而且炎症因子肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白介素(IL)-1 β

可促进神经营养因子分泌^[15]。因此炎症因子刺激 BDNF 增加,加强了 BDNF 与炎症反应的关联,为 其在炎性水肿中发挥作用奠定了基础。BDNF 在过 敏患者中可刺激 IL-6 增加,进一步支持 BDNF 可能 通过炎症因子调节过敏反应的观点^[16],从另一个角 度提示 BDNF 与炎症水肿相关。

本实验中,通过免疫组织化学技术,我们还定位 了 BDNF 在肺组织的分布。结果显示,肺气道上皮 和平滑肌均有 BDNF 染色,提示 BDNF 发挥生物功 能可能与肺上皮和平滑肌有关。文献显示,BDNF 发挥作用与其受体酪氨酸蛋白激酶 B(trkB)激活下 游信号转导途径有关,已知上皮和平滑肌有神经营 养因子受体 trk 和 P75 表达^[17],因此,增加的 BDNF 可与其受体 trkB 结合,进而激活下游信号分子发挥 作用^[18]。此外,BDNF 可通过神经调节机制影响气 道扩张和平滑肌迁移^[19],从而在气道重塑和炎症反 应中发挥作用。

本实验为了解 BDNF 与脑缺血肺水肿的关系 提供了初步的实验依据。结果将有利于进一步研究 BDNF 在脑缺血肺水肿中的作用,为进一步阐明脑 缺血肺损伤的神经调节机制奠定基础。在随后的工 作中,要逐一研究 BDNF 下游分子受体、信号及炎 症因子在脑缺血肺损伤中的变化,并逐一阐明 BDNF 对下游信号及炎症因子的调控。

参 考 文 献

- Li XL, Liu J, Wang XY, *et al.* Temporal changes in the expression of TGF-beta 1 and EGF in the ventral horn of the spinal cord and associated precentral gyrus in adult Rhesus monkeys subjected to cord hemisection. *J Neurol Sci*,2008;268 (1-2):163-171.
- Chen J, Qi JG, Zhang W, *et al.* Electro-acupuncture induced NGF, BDNF and NT-3 expression in spared L6 dorsal root ganglion in cats subjected to removal of adjacent ganglia. *Neurosci Res*,2007;59(4):399-405.
- Ba YC, Dai P, Zhou HL, *et al.* Spatiotemporal changes of NGF, BDNF and NT-3 in the developing spinal cords of embryonic chicken. *Neurochem Res*,2010;35(2):273-278.
- Zhang J, Yu Z, Yu Z, *et al.* RAAV-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor promotes neurite outgrowth and protects neurodegeneration in focal ischemic model. *Int J Clin Exp Pathol*,2011;4(5):496-504.
- Zhu JM, Zhao YY, Chen SD, *et al.* Functional recovery after transplantation of neural stem cells modified by brain-derived neurotrophic factor in rats with cerebral ischaemia. *J Int Med Res*,2011;39(2):488-498.
- Lee DH, Geyer E, Flach AC, *et al.* Central nervous system rather than immune cell-derived BDNF mediates axonal protective effects early in autoimmune demyelination. *Acta Neuropathol*,2012;123(2):247-258.
- Joseph MS, Tillakaratne NJ, de Leon RD. Treadmill training stimulates brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in motor neurons of the lumbar spinal cord in spinally transected rats. *Neuroscience*,2012;224:135-144.
- Nockher WA, Renz H. Neurotrophins in clinical diagnostics: pathophysiology and laboratory investigation. *Clin Chim Acta*, 2005;352(1-2):49-74.
- Sariola H. The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci*,2001;58(8):1061-1066.
- Xiyang YB, Liu S, Liu J, *et al.* Roles of platelet-derived growth factor-B expression in the ventral horn and motor cortex in the spinal cord-hemisectioned rhesus monkey. *J Neurotrauma*,2009;26(2):275-287.
- Yang HJ, Yang XY, Ba YC, *et al.* Role of neurotrophin 3 in spinal neuroplasticity in rats subjected to cord transection. *Growth Factors*,2009;27(4):237-246.
- Ma H, Yu B, Kong L, *et al.* Neural stem cells over-expressing brain-derived neurotrophic factor (BDNF) stimulate synaptic protein expression and promote functional recovery following transplantation in rat model of traumatic brain injury. *Neurochem Res*,2012;37(1):69-83.
- Rong R, Men BL, Wang TH, *et al.* Role of BDNF in neuroplasticity of the spinal cord in cats subjected to partial dorsal ganglionectomy. *Growth Factors*,2011;29(6):263-270.
- Hahn C, Islamian AP, Renz H, *et al.* Airway epithelial produce neurotrophins and promote the survival of during allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*,2006; 117(4):787-794.
- Fox AJ, Patel HJ, Barnes PJ, *et al.* Release of nerve growth factor by human pulmonary epithelial cells: role in airway inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol*,2001;424(2):159-162.
- Noga O, Peiser M, Altenahr M, *et al.* Selective induction of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor by LPS and allergen in dendritic cells. *Clin Exp Allergy*,2008;38 (3):473-479.
- Nockher WA, Renz H. Neurotrophins in clinical diagnostics: pathophysiology and laboratory investigation. *Clin Chim Acta*, 2005;352(1-2):49-74.
- Huang YT, Lai PC, Wu CC, *et al.* BDNF mediated TrkB activation is a survival signal for transitional cell carcinoma cells. *Int J Oncol*,2010;36(6):1469-1476.
- Dagnell C, Kemi C, Klominek J, *et al.* Effects of neurotrophins on human bronchial smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Transl Res*,2007;150(5):303-310.

(2012-07-18 收稿,2012-09-25 修回)

编辑 吕 熙