研究报告

成年中缅树鼩大脑 BDNF、trkB、ChAT mRNA 与蛋白的表达

郑 红[1],牛世伟[2],李进涛[1],薛整风[3],张荣平[4],角建林[1]

(1. 昆明医科大学实验动物学部,昆明 云南 650500;2. 昆明理工大学生命科学与技术学院,昆明 云南 650505;
3. 扬州大学兽医学院,扬州 江苏 225009;4. 昆明医科大学生物工程中心,昆明 云南 650031)

【摘要】 目的 观察成年中缅树鼩大脑 BDNF、trkB、ChAT mRNA 及蛋白的表达。**方法** 利用 q-PCR 和 Western blotting 方法检测成年中缅树鼩大脑海马、基底核和皮层 BDNF、trkB、ChAT mRNA 及蛋白的表达。**结果** 成年树鼩大脑 BDNF mRNA 在海马最高,与基底核和皮层差异具有显著性($P<0.01$);trkB mRNA 在海马最低,额叶皮层最高,二者间差异显著($P<0.05$);ChAT mRNA 在海马、基底核和额叶皮层的表达差异无显著性($P>0.05$)。成年树鼩大脑 BDNF 蛋白表达在基底核最高,与海马或皮层有显著性差异($P<0.01$);树鼩大脑 3 个部位 trkB、ChAT 蛋白表达差异无显著性($P>0.05$)。**结论** 成年树鼩大脑海马、基底核和皮层 ChAT mRNA 表达与蛋白表达具有一致性;而 BDNF、trkB mRNA 表达与蛋白表达不对应。推测树鼩大脑 BDNF/trkB 比 ChAT 具有更为复杂的转录水平调控模式,树鼩可能是研究 BDNF/trkB 基因表达的影响机制的良好动物。

【关键词】 树鼩;BDNF;TrkB;ChAT;Western blotting;q-PCR
【中图分类号】R-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2015) 12-0021-05
doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2015.12.005

Expression levels of BDNF, trkB and ChAT in the brain of adult tree shrew (*Tupaia belangeri*)

ZHENG Hong[1], NIU Shi-wei[2], LI Jin-tao[1], XUE Zheng-fong[3], ZHANG Rong-ping[4], JIAO Jian-lin[1]

(1. Department of Laboratory Animal Science, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;
2. Life Science and Technology College, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650505;
3. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009;
4. Department of Biological Engineer, Kunming Medical University, Kunming 650031)

【Abstract】 Objective To investigate the expression levels of BDNF, trkB and ChAT mRNA and proteins in the brain of adult tree shrews (*Tupaia belangeri*). **Methods** Quantitative real-time PCR was employed to detect the expression levels of BDNF, trkB and ChAT mRNA in the hippocampus, basal ganglia and frontal cortex of adult tree shrews. The expression levels of BDNF, trkB and ChAT proteins and β-actin was used as internal standard. **Results** The expression level of BDNF mRNA was highest in the hippocampus of adult tree shrew, and there were significant differences between that in the hippocampus, and basal ganglia and frontal cortex ($P<0.01$). The expression level of trkB mRNA was higher in the frontal cortex than in the basal ganglia and hippocampus, showing a significant difference between them ($P<$

[**基金项目**]国家科技支撑计划项目(2014BAI01B01);云南省科技厅应用基础研究联合专项项目(2012FB022)。
[**作者简介**]郑红(1969 -),女,高级实验师,硕士生导师,在读博士,研究方向:疾病动物模型,E-mail:847255170@qq.com。
[**通讯作者**]角建林(1966 -),男,高级实验师,学士,研究方向:树鼩标准化与疾病模型,E-mail:jiaojianlin66@163.com。

0.05). The expression level of BDNF protein was significantly higher in the basal ganglia than in the hippocampus or frontal cortex ($P<0.01$). There were no significant difference ($P>0.05$) in the expressions of trkB protein among the hippocampus, basal ganglia and frontal cortex of the adult tree shrews. There were no significant differences in expressions of ChAT mRNA and protein among the hippocampus, basal ganglia and frontal cortex in adult tree shrews ($P>0.05$). **Conclusions** The expression levels of ChAT mRNA were consistent with that of ChAT protein in the hippocampus, basal ganglia and frontal cortex of adult tree shrews, while the expression levels of BDNF and trkB mRNA were not consistent with their proteins, which might indicate that the transcriptional regulation pattern might be more complex. Tree shrew is a valuable animal model in the study of mechanism of BDNF/trkB gene expression.

【**Key words**】 Tree Shrews; BDNF; TrkB; ChAT; Western Blotting; q-PCR

脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)对神经元的发生、生长、分化及再生及可塑性是至关重要的。原肌球蛋白相关激酶 B(tropomyosin related kinase B, trkB)包括全长型和截断型,全长型 trkB 是 BDNF 的受体[1]。BDNF-trkB 通过激活细胞外信号调节激酶(ERK)、磷酸肌醇激酶 3(PI3K)和磷脂酶 Cγ(PLCγ)信号通路发挥作用[2]。BDNF 与阿尔茨海默病、抑郁症、精神分裂症、脑卒中、肿瘤、耳鸣等疾病的发生、发展有关[3]。胆碱乙酰转移酶(choline-acetyltransferase, ChAT)是乙酰胆碱(Ach)合成酶,乙酰胆碱是与学习、记忆有关的重要神经递质。ChAT 作为胆碱能神经元的特殊标志,与胆碱能神经元的功能高度相关[4]。对 BDNF、trkB 及 ChAT 的研究为相关疾病诊疗提供新思路。

树鼩是广泛分布于我国西南部及南部的小型哺乳动物,在神经发育、生理解剖和心理应激模式等方面与灵长类,甚至与人类高度相似[5]。树鼩拥有哺乳动物中最大的脑-体重比,是研究脑功能和神经退行性疾病的理想模型[6]。作为具有潜在应用价值的新型模式动物,树鼩正在成为人们关注的焦点[7]。对树鼩大脑 BDNF、trkB 及 ChAT 的研究,仅限于体外或海马区,尚未见其他区域[8-9]。本研究以成年雄性树鼩为对象,检测大脑海马、基底核、皮层的 BDNF、trkB 及 ChAT 的 mRNA 及蛋白的表达,为开展神经细胞发生和神经退行性疾病研究提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

昆明医科大学饲养的雄性滇缅树鼩(*Tupaia belangeri*)10 只,年龄为 12 ~ 15 月龄(生产许可证:SCXK(滇)2013 - 0002)。用于 PCR 检测和 Western blotting 的各 5 只。实验程序符合昆明医科大学动物实验伦理委员会的要求(KMMU 2015002),并遵守国际惯例。

1.2 试剂和抗体

引物基因合成购自上海英俊生物科技有限公司;组织细胞裂解液、总 RNA 提取试剂盒、PCR MasterMix 试剂购自北京天根公司;逆转录试剂盒购自 GeneCopoeia 公司;羊抗兔 BDNF 和 TrkB 多克隆抗体购买自 Santa Cruz Biotechnology 公司;柯达胶片、压片暗盒(5 × 7 英寸)购自 Beyotime 公司。

丙烯酰胺(Acr)、苯甲磺酰氟(PMSF)、N,N-亚甲基双丙烯酰(Bis)、十二烷基磺酸钠(SDS)、N, N, N,N-四甲基二乙胺(TEMED)甘氨酸(Glydn)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、三(羟甲基)甲基甘氨酸(tricine)及购买自 Sigma 公司。二喹啉甲酸(BCA)、过硫酸铵(AP)、小牛血清白蛋白(BSA)及蛋白测定试剂盒,购自碧云天公司。预染的高、低分子量蛋白标准购买自 Gibco 公司。PVDF 膜购买自 Hybond 公司。化学发光试剂 ECL 购买自 Millipore 公司。羊抗兔 BDNF 和 TrkB 多克隆抗体购买自 Santa Cruz 公司,兔抗人胆碱乙酰转移酶多克隆抗体(ChAT):Millipore 公司。二抗均购买自中杉金桥公司。

1.3 脑组织 RNA 的提取及实时定量聚合酶链反应(quantitative real-time PCR, q-PCR)

Trizol 法常规提取树鼩脑海马、基底核、额叶皮层组织 RNA,取 1 μL 检测 RNA 浓度和纯度。取 2 μL,电泳 30 min(1 % 琼脂糖凝胶)后,紫外灯下摄像分析。A 值(A 260/280)在 1.8 ~ 2.1 之间,具有二条清晰电泳条带的 RNA 溶液, - 80℃保存备用。按照逆转录试剂盒操作程序,以总 RNA 为模板,逆转录为 cDNA,20℃保存备用。所得的逆转录产物可用 DEPC 水稀释 5 倍后进行下游 qPCR 反应。BDNF:上游引物 5′-AGCCT CCTCTGCTCTTTCTG-3′;下游引 5′-TTTATCTGCCGCTGTGAC C-3′。TrkB:

上游引物 5′-GCTTCTGGAGGGCTTCTCTT-3′;下游引物 5′-TGTTCTCTGGGTCAATGCTG 3′。CHAT:上游引物 5′-CTGGTGAACCCCTTAAGC-3′;下游引物 5′-GTCGAAAAGGGACACAGC 3′。内参 β-actin:上游引物 5′-AACCCTAAGGCC AACCGTGAAAAAG-3′;下游引物 5′-TCATGAGTAGTCTGTCAGGT -3′。

在 PCR 反应管中充分混匀反应 mix,短暂离心,置入 System 7300 荧光定量 PCR 仪中进行 q-PCR 实验。反应条件为:95 ℃预变性 10 min;95℃变性 10 s;60℃退火 20 s;72℃ 延伸 34 s,40 个循环。检测各模板的 Ct 值(C 代表 cycle,T 代表 threshold)。Ct 值为荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。ΔCt 越大,起始拷贝数越小,表达越低。Folds $=2^{-\Delta\Delta Ct}$。

1.4 脑组织总蛋白的提取及 Western blotting

取树鼩脑组织,加入细胞裂解液(1000 μL)和蛋白保护液(10 μL),匀浆机研磨。4℃,12 000 r/min 离心 15 min;取上清液,用 BCA 试剂盒进行蛋白质定量。按 1:1 充分混合样品与 1 × SDS 凝胶上样缓冲液,100℃水浴煮沸。使用 10% SDS-PAGE 电泳分离,电转移至硝酸纤维素膜(300 mA,20 ~ 35 min),加入含 5% 牛奶的 TBST 封闭缓冲溶液封闭,抗体 4℃过夜杂交。次日 TBST 洗膜,辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1h,鲁米那 (luminol) 溶液显影定影。用扫描仪扫描后,进行灰度分析。以 β-actin 作为内参进行标准对照。

1.5 统计学方法

数据以均数 ± 标准差表示,采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计检验。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA);方差齐性的多重比较采用 LSD 法,方差不齐时采用 Dunnett's T3 法。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 q-PCR

成年树鼩大脑 BDNF mRNA 在海马最高,基底核为海马的 0.395 倍,额叶皮层为 0.392 倍。树鼩大脑 3 个部位 BDNF mNA 水平差异具有显著性 ($F=144.065$, $P<0.001$)。海马显著高于基底核($P<0.01$)和额叶皮层($P<0.01$),基底核和额叶皮层 BDNF mRNA 的表达很接近($P>0.05$)。

树鼩大脑 trkB mRNA 在海马最低,额叶皮层最高,为海马的 1.282 倍;基底核是海马的 1.168 倍。3 个部位 trkB mRNA 水平具有显著差异($F=19.678$, $P<0.001$)。海马与皮层间($P<0.05$)差异显著。基底核与海马($P>0.05$)、基底核与皮层间($P>0.05$)差异无显著性。

树鼩大脑 ChAT mRNA 在海马、基底核和额叶皮层的表达差异无显著性 ($F=3.158$, $P>0.05$))。基底核略高,为海马的 1.098 倍;额叶皮层最低,是海马的 0,891 倍(图 1)。

2.2 Western blotting

成年树鼩大脑 BDNF 蛋白表达在基底核最高(图 2)。大脑 3 个部位 BDNF 蛋白水平差异具有显著性 ($F=33.877$, $P<0.001$)。基底核显著高于海马($P<0.01$)和额叶皮层($P<0.01$),海马与额叶皮层接近($P>0.05$)。

成年树鼩大脑 trkB 蛋白表达在海马、基底核、额叶皮层无显著差异($F=3.341$, $P>0.05$)。海马稍高,皮层次之,基底核较低(图 3)。与 trkB 蛋白

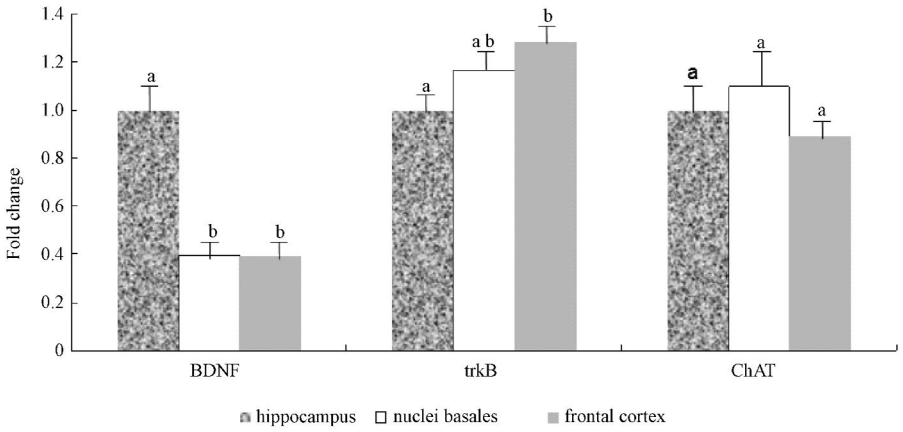

图 1 树鼩大脑 BDNF mRNA、trkB mRNA 和 ChAT mRNA

Fig. 1 BDNF mRNA, trkB mRNA and ChAT mRNA in the brain of adult tree shrews

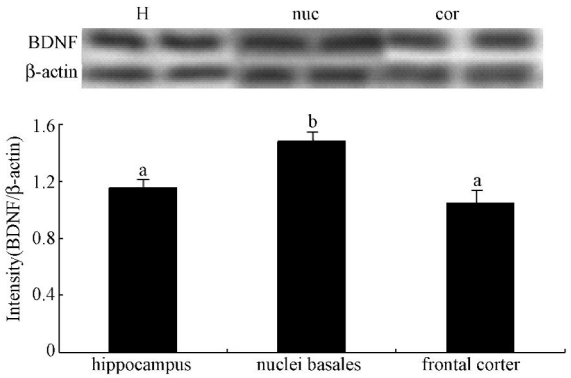

图 2 树鼩大脑 BDNF 蛋白表达

Fig. 2 Expression of BDNF in the brains of adult tree shrews

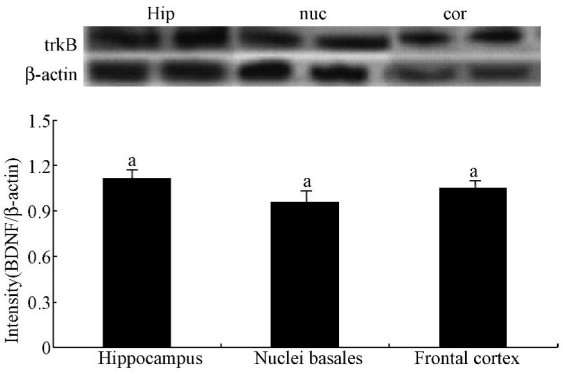

图 3 树鼩大脑 trkB 蛋白表达

Fig. 3 Expression of trkB in the brains of adult tree shrews

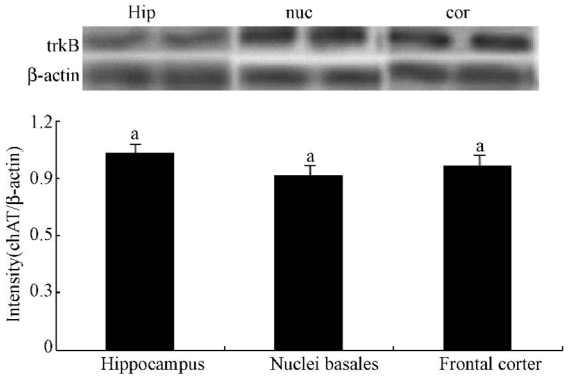

图 4 树鼩大脑 ChAT 蛋白表达

Fig. 4 Expression of ChAT in the brains of adult tree shrews

相似,在树鼩大脑 3 个部位的 ChAT 蛋白表达差异无显著性 ($F = 3.277$, $P > 0.05$)(图 4)。

3 讨论

基底核是脑内主要的胆碱能神经元分布区,由此发出的胆碱能纤维投射至海马和大脑皮质,释放的 Ach 占大脑皮质释放的 Ach 的绝大部分,对认知、记忆活动起着重要的作用。ChAT 是 Ach 的生物合成酶,仅存在于胆碱能神经元中。乙酰胆碱酯酶(AchE)是 Ach 的分解酶,ChAT 和 AchE 共同维持着 Ach 的动态平衡。ChAT 是胆碱能神经的标志酶,与 Ach 的分布几乎平行,故常作为 Ach 的间接指标[10]。本实验发现成年树鼩大脑海马、基底核、额叶皮层 ChAT mRN 表达与蛋白质的表达虽然略不同,但差异无显著性,ChAT mRN 表达与蛋白质表达具有一致性。提示 ChAT 可能就在原位产生。基底前脑的胆碱能神经元及其投射纤维的退行性变是老年认知障碍等神经退行性疾病最早和最显著的病理变化,本实验获得的树鼩海马、基底核、额叶皮层 ChAT mRN 表达与蛋白质的表达的信息,为利用树鼩进行阿尔茨海默病等神经退行性疾病研究提供基础数据。

蛋白质是行使细胞功能的主要承担者,蛋白质是细胞状态和功能的直接描述。mRNA 是连接基因的遗传信息与执行生物功能的蛋白质的纽带,也是研究基因表达的主要手段。转录水平的调控是生物体最重要的调控方式,是目前研究最多的基因表达调控方式[7]。BDNF/trkB 信号通路对神经元有营养作用,促进神经元的存活、分化、生长,在神经系统发育过程中促进神经干细胞的增殖分化,减少神经退行性变,参与神经损伤后修复等[11-12]。BDNF 主要分布于大脑皮质、海马、基底前脑、纹状体等胆碱能神经元中[13]。本研究树鼩海马中 BDNF mRNA 显著高于基底核和皮层($P < 0.01$),而 BDNF 蛋白为基底核显著高于海马和皮层($P < 0.01$),表明 BDNF mRN 表达与蛋白质表达是不对应的。有文献报道 BDNF 在大脑的表达有自分泌和旁分泌模式[14]。自身分泌来源的 BDNF 足以支持正常的成年海马新生神经元树突发育[15]。推测树鼩海马 BDNF 以自分泌为主,而基底核 BDNF 由于旁分泌的补充,使得树鼩在基底核的 BDNF 蛋白的表达高于海马。TrkB 为 BDNF 的高亲和力受体,广泛存在于神经系统。本研究树鼩海马中 TrkB mRNA 在皮层中最高,与海马差异显著($P > 0.05$),但 TrkB 蛋白的表达在海马、基底核、额叶皮层无显著差异。

成年树鼩大脑海马、基底核和皮层 ChAT mRNA 表达与蛋白表达具有一致性;而 BDNF、trkB mRNA 表达与蛋白表达不对应。提示 ChAT 可能就在原位产生,而 BDNF、trkB 由于旁分泌的存在,在不同部位 mRNA 与蛋白表达可能对应或不对应,推测树鼩

大脑 BDNF/trkB 比 ChAT 具有更为复杂的转录水平调控模式。树鼩可能是开展 BDNF/trkB 基因表达的影响机制研究的良好动物模型。

参考文献：

[1] Liu XH, Geng Z, Yan Jing, et al. Blocking GSK3β-mediated dynamin 1 phosphorylation enhances BDNF-dependent TrkB endocytosis and the protective effects of BDNF in neuronal and mouse models of Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Dis, 2015, 74: 377 – 391.

[2] 张芳, 周新富, 肖志成. BDNF/TrkB 通路与 β-淀粉样蛋白的关系研究进展 [J]. 中华神经医学杂志, 2013, 12(8): 857 – 859.

[3] 吴莎, 华清泉, 杨琨, 等. 脑源性神经营养因子研究进展 [J]. 中华临床医师杂志电子版, 2013, 7(9): 3988 – 3990.

[4] Bisaglia M, Venezia V, Piccioli P, et al. Acetaminophen protects hippocampal neurons and PC12 cultures from amyloid beta-peptides induced oxidative stress and reduces ChAT activation [J]. Neurochem Int, 2002, 41(1): 43 – 54.

[5] 徐新平, 陈红波, 贲昆龙. 树鼩在医学生物学中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(3): 187 – 190.

[6] Previc FH. The dopaminergic mind in human evolution and history [M]. Cambridge, Cambridge University Press, 2009: 54 – 86.

[7] 郑永唐, 姚永刚, 徐林, 等. 树鼩基础生物学与疾病模型 [M]. 昆明: 云南科学技术出版社, 2014: 3 – 5.

[8] Knabe W, Washausen S, Happel N, et al. Starburst cholinergic amacrine cells in the tree shrew retina [J]. J Comp Neurol, 2007, 502(4): 584 – 597.

[9] 角建林, 何保丽, 郑红, 等. BDNF 在树胸和大鼠中枢神经系统的表达差异及其与学习记忆功能进化的关系(摘要) [J]. 昆明医科大学学报, 2010, 31(10): 138.

[10] 王忆杭, 肖培根, 刘新民. 连翘酯苷对拟 AD 复合动物模型小鼠学习记忆的改善作用及其机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(5): 423 – 427, 445.

[11] 纪萌, 刘玉娟, 赵京杰, 等. 骨髓间充质干细胞经 BDNF 基因修饰后移植治疗大鼠半横断脊髓损伤的电生理研究 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 93 – 97.

[12] 王中平, 熊小琴, 崔卫刚, 等. 脑源性神经营养因子/酪氨酸激酶受体 B 信号通路抑制剂 K252a 逆转丙戊酸 [J]. 解剖学杂志 2013, 36(1): 4 – 7.

[13] Zhang HT, Li LY, Zou XL, et al. Immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult rhesus monkey brains [J]. J Histochem Cytochem, 2007, 55(1): 1 – 19.

[14] Wang L, Chang X, She L, et al. Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons [J]. J Neurosci, 2015, 35(22): 8384 – 8393.

〔修回日期〕2015 – 11 – 10

(上接第 14 页)

[17] 罗尧岳, 周小青, 沈剑刚, 等. 活血化瘀类方对心血瘀病理影响的定性定量研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(2): 509 – 512.

[18] 陈云华, 张硕峰, 孙建宁, 等. 血塞通滴丸抗大鼠血栓形成及溶栓作用的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(3): 253 – 256.

[19] 韩淑燕, 李海霞, 文宗曜, 等. 三七总皂苷对急性血瘀大鼠血液流变学的改善作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2009, 23(3): 183 – 187.

[20] 陈妍, 马健, 杨燕, 等. 三七总皂甙片对药物涂层支架植入术后早期 ADP 诱导的血小板凝集的影响 [J]. 实用医学杂志, 2012, 28(8): 1347 – 1349.

〔修回日期〕2015 – 11 – 02