

脑源性神经营养因子对皮质酮诱导新生大鼠海马神经元凋亡的保护作用

王英俊, 董玉斌, 栾永刚, 曹亚芹, 黄娜娜

周口市中心医院, 河南 周口 466000

摘要: **目的** 探讨脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)对皮质酮诱导新生大鼠海马神经元凋亡的保护作用。**方法** 原代培养新生大鼠海马神经元,并分成对照组、皮质酮组、皮质酮+BDNF组,皮质酮造模浓度为100 μM ,分别采用浓度为0.1、1、10、25、50、100 ng/ml的BDNF干预,造模及干预时间均为24 h。CCK8法测定细胞活力,分析BDNF的最佳作用浓度,流式细胞术和Hoechst荧光染色检测细胞的凋亡情况,免疫印迹(Western-blotting)法检测细胞Caspase-3、Caspase-9的表达水平。**结果** 与对照组比较,皮质酮组神经元凋亡率由(10.7 \pm 1.2)%上升为(33.9 \pm 3.5)%($t=18.707, P<0.01$),胞体透亮,部分细胞核碎裂,凋亡特征明显,Caspase-3、Caspase-9表达显著上调($t_1=27.098, P_1<0.01; t_2=24.311, P_2<0.01$);BDNF作用后,细胞活力显著上升,在浓度为1 ng/ml时与皮质酮组比较差异有统计学意义($t=3.562, P<0.05$),分析得出BDNF最佳浓度为48 ng/ml;BDNF(48 ng/ml)干预完成后,细胞凋亡率较皮质酮组下降至(18.7 \pm 2.1)%,差异有统计学意义($t=11.478, P<0.01$),细胞形态基本恢复正常,Caspase-3、Caspase-9表达明显下调($t_1=17.341, P_1=0.002; t_2=14.993, P_2=0.005$)。**结论** BDNF能有效拮抗皮质酮诱导的海马神经元凋亡,保护神经元细胞。

关键词: 皮质酮; BDNF; 新生大鼠; 海马; 神经元凋亡

中图分类号:R651 文献标识码:A 文章编号:1006-3110(2019)06-0699-05 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2019.06.016

Protective effect of brain-derived neurotrophic factor on corticosterone-induced apoptosis in hippocampal neurons of neonatal rats

WANG Ying-jun, DONG Yu-bin, LUAN Yong-gang, CAO Ya-qin, HUANG Na-na

Zhoukou Central Hospital, Zhoukou, Henan 466000, China

Abstract: **Objective** To explore the protective effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on corticosterone-induced apoptosis in hippocampal neurons of neonatal rats. **Methods** Primary cultured hippocampal neurons of neonatal rats were divided into the control group, the corticosterone group and the corticosterone+BDNF group. The concentration of corticosterone was 100 μM , BDNF interventions were used with concentration of 0.1, 1, 10, 25, 50, and 100 ng/mL, and the modeling and intervention time were both 24 hours. Cell viability was determined by CCK8 method, the optimal concentration of BDNF was analyzed, the apoptosis of cells was detected by flow cytometry and Hoechst fluorescent staining, and the expression levels of Caspase-3 and Caspase-9 were detected by Western-blotting method. **Results** Compared with the control group, the apoptotic rate of neurons in the corticosterone group increased from (10.7 \pm 1.2)% to (33.9 \pm 3.5)% ($t=18.707, P<0.01$), the cell body was translucent,

作者简介:王英俊(1982-),男,河南省周口市人,主治医师,主要从事新生儿科工作。

- [28] 高俊岭,傅华,祝增珠,等. 工作场所社会资本与流动人口吸烟及自评健康关系的多水平分析[J]. 中国健康教育,2014,30(12):1059-1063,1093.
- [29] 秦春莉,罗炯,孙逊,等. 社会资本因素对青少年健康行为的影响研究[J]. 中国体育科技,2016,52(2):105-114.
- [30] 张宏杰,陈玮,王建辉,等. 河北省中学生社会资本对健康行为的影响[J]. 中国学校卫生,2017,38(7):1032-1034.
- [31] 姬玉,罗炯. 青少年社会资本与健康行为间的相关性[J]. 中国学校卫生,2017,38(6):835-839.
- [32] Bezerra IA, Goes PS. Association between social capital and oral health conditions and behavior[J]. Cien Saude Colet,2014,19(6):1943-1950.
- [33] Mohnen SM, Völker B, Flap H, et al. Health-related behavior as a mechanism behind the relationship between neighborhood social capital and individual health - a multilevel analysis[J]. BMC Public Health,2012,12(1):116.
- [34] Chuang YC, Huang YL, Tseng KC, et al. Social capital and health-protective behavior intentions in an influenza pandemic[J]. PLoS One,2015,10(4):e0122970.
- [35] Nieminen T, Prattala R, Martelin T, et al. Social capital, health behaviours and health: a population-based associational study[J]. BMC Public Health,2013,13(1):1-11.
- [36] Pattussi MP, Olinto MTA, Canuto R, et al. Workplace social capital, mental health and health behaviors among Brazilian female workers[J]. Soc Psych Psych Epid,2016,51(9):1321-1330.
- [37] Kim YC, Ji YL, Park K. Effects of health literacy and social capital on health information behavior[J]. J Health Commun,2015,20(9):1084-1094.
- [38] Child S, Stewart S, Moore S. Perceived control moderates the relationship between social capital and binge drinking: longitudinal findings from the Montreal Neighborhood Networks and Health Aging (MoNNET-HA) panel[J]. Ann Epidemiol,2017,27(2):128-134.

收稿日期:2018-12-24

some of the nuclei were fragmented, the apoptosis characteristics were obvious, and the expression of Caspase-3 and Caspase-9 was significantly up-regulated ($t_1 = 27.098$, $P_1 < 0.001$; $t_2 = 24.311$, $P_2 < 0.01$). After BDNF treatment, the cell viability increased significantly, and the difference was statistically significant at the concentration of 1 ng/mL between the control group and the corticosterone group ($t = 3.562$, $P < 0.05$). The optimal concentration of BDNF was 48 ng/ml. After BDNF (48 ng/ml) intervention, the apoptosis rate decreased to $(18.7 \pm 2.1)\%$ compared with the corticosterone group, showing a statistically significant difference ($t = 11.478$, $P < 0.01$). The cell morphology returned to normal, and the expression of Caspase-3 and Caspase-9 was down-regulated ($t_1 = 17.341$, $P_1 = 0.002$; $t_2 = 14.993$, $P = 0.005$). **Conclusions** BDNF can effectively antagonize corticosterone-induced hippocampal neuronal apoptosis and protect neuronal cells.

Key words: corticosterone; brain-derived neurotrophic factor; neonatal rat; hippocampus; neuronal apoptosis

新生儿脑损伤是围生期严重的并发症之一,常导致新生儿死亡以及幸存者后期智力低下、癫痫和脑性瘫痪等严重的神经功能残损,严重危害了新生儿的生命健康和生存质量^[1]。外源性和内源性应激是导致脑损伤的关键原因,新生儿大脑对体内外应激十分敏感,常导致免疫稳态失衡,机体内环境紊乱,下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA)轴功能异常,进而危害到脑内神经元^[2]。研究显示,HPA轴末端产物皮质酮可以引起海马神经元突触缺失并诱导神经元凋亡,加速海马萎缩,从而影响认知功能^[3]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)作为应用于临床的一类神经营养因子,已被广泛证实在神经元的存活、生长、分化等过程中作用关键^[4],但其在皮质酮导致的海马神经元凋亡过程中能否起到保护作用,尚未见相关报道。基于此,本研究在建立皮质酮诱导海马神经元损伤模型的基础上,摸索出最佳的BDNF作用浓度,并探讨其对神经元凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 24只SPF级出生24h内的SD大鼠,雌雄不限,由河南省实验动物中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(豫)2015-0005,实验动物使用许可证号为SYXK(豫)2016-0002号,实验条件:温度22℃~24℃,湿度45%~55%,昼/夜12h/12h,饲养期间动物自由饮水摄食。本研究经本院伦理委员会批准后进行。

1.2 试剂与主要仪器 Neurobasal神经元培养基、DMEM/F12培养基、胎牛血清等均购自美国Gibco公司;皮质酮、BDNF购自美国Sigma公司;神经元特异烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cysteiny aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-9(cysteiny aspartate specific proteinase-9, Caspase-9)多克隆抗体购自英国Abcam公司;Hoechst

33258染液、CCK8试剂盒购自武汉博士德公司;CO₂培养箱、酶标仪购自美国Thermo公司;倒置荧光显微镜购自日本OLYMPUS公司;流式细胞仪购自美国BD公司。

1.3 海马神经元原代培养 取出生24h内的新生鼠,酒精消毒后剥离大脑,显微镜下分离两侧海马组织,置于4℃预冷的DMEM/F12培养基中,除去脑膜组织和微血管,手术剪将海马组织剪碎,加入1ml 0.25%胰酶于培养箱中消化15min,加入适量胎牛血清终止消化;过200目细胞筛,1000 r/min离心5min,倒去上清液,加入DMEM/F12培养基吹打成细胞悬液,接种于细胞培养板内,37℃、5%CO₂培养箱内培养,次日更换为Neurobasal无血清培养基,以后每3d换液一次。

1.4 海马神经元鉴定 将海马神经元细胞接种于96孔板内,培养7d后,弃去培养液,PBS洗涤3次,多聚甲醛固定,滴加NSE多克隆抗体,4℃孵育过夜;滴加二抗检测试剂,37℃孵育30min,按DAB试剂盒的操作说明进行染色,DAB显色20min后,倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.5 分组与处理 将培养的大鼠海马神经元细胞分成对照组、皮质酮组、皮质酮+BDNF组,参考文献方法^[5],采用100 μM皮质酮干预诱导海马神经元凋亡,皮质酮+BDNF组在给予皮质酮造模的同时给予不同剂量的BDNF(包括0.1、1、10、25、50、100 ng/ml 6个浓度),对照组则给予等量PBS。造模及药物干预时间均为24h。

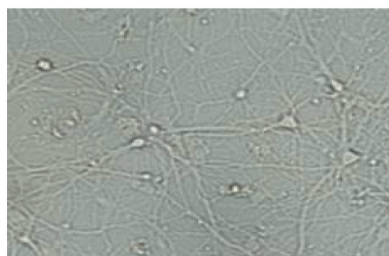
1.6 CCK8法检测神经元活力,计算BDNF最佳作用浓度 将神经元接种于96孔板中,平行组设6复孔,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养5~7d,待神经元基本成熟后,根据上述实验分组处理24h后,再加入5 μl/孔的CCK-8溶液继续培养3h,用酶标仪在450 nm下检测OD值。以对照组的活力为100%,根据各孔细胞OD值,计算细胞活力/% = (实验组OD均值/对照组OD均值) × 100%,采用SPSS 19.0软件计

算 BDNF 最佳作用浓度。实验重复 3 次。

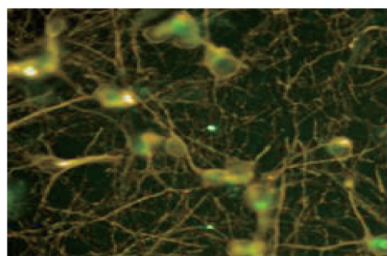
1.7 流式细胞仪检测海马神经元凋亡 将神经元接种于 6 孔板中,置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中培养 5~7 d,待神经元基本成熟后,加入药物干预处理 24 h,收集上清液并用 PBS 洗涤 2 次,收集全细胞,每组样本测定 3×10^4 个细胞,流式细胞仪上机检测,采用 Cell Quest 软件分析细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.8 Hoechst 荧光染色检测海马神经元凋亡形态变化 将神经元接种于 96 孔板中,平行组设 6 复孔,置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中培养 5~7 d,待神经元基本成熟后,加入皮质酮或 BDNF 干预后,于培养箱中继续培养 24 h。取出 96 孔板,弃去培养液,加入 PBS 液洗涤 3 次,然后每孔加入 Hoechst 33258 染液 100 μl,于 37 ℃避光孵育 30 min;孵育完成后,弃去染液并洗涤 2 次,显微镜下观察各组细胞的凋亡情况。实验重复 3 次。

1.9 免疫印迹法检测 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达 收集神经元细胞样本,加入一定量 RIPA 液裂解,



培养 7 d 的神经元



NSE 鉴定结果

图 1 海马神经元形态学观察及鉴定结果(×200)

2.2 CCK8 法检测细胞活力 CCK8 法检测结果显示,以对照组细胞活力为 100.0%,皮质酮组神经元活力仅为(50.4±2.4)%,说明皮质酮对海马神经元损伤作用明显($t=22.301, P<0.001$);而不同浓度的 BDNF 干预后,皮质酮对神经元的损伤作用显著下降,细胞活力明显提升,当 BDNF 浓度为 1 ng/ml 时,即有统计学差异($t=3.562, P<0.05$),并呈一定的剂量依赖性。根据各浓度下的细胞活力结果,采用 SPSS 19.0 软件进行 logistic 回归分析,计算 BDNF 的最佳作用浓度为 48 ng/ml。结果见图 2。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 见图 3。对照组细胞早期凋亡率为(10.7±1.2)%,皮质酮组为(33.9±3.5)%,与对照组比较,有统计学差异($t=18.707, P<0.01$),在给与最佳剂量 BDNF(48 ng/ml)干预后,神经元凋亡率降低为(18.7±2.1)%,与皮质酮组比较,有统计学差异($t=11.478, P<0.01$)。

2.4 Hoechst 染色检测神经元凋亡形态变化 Hoechst

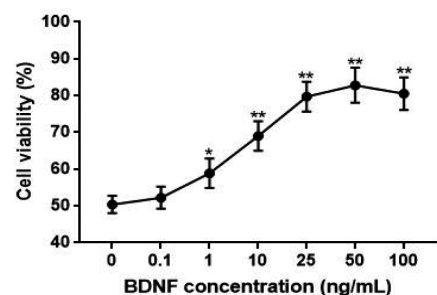
于 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液为细胞蛋白样本,测定总蛋白含量。制备分离胶和浓缩胶,蛋白上样,跑电泳,完成后转膜,5%脱脂奶粉室温下封闭 1 h,加入稀释后的一抗,4 ℃冰箱孵育过夜。次日用 TBST 液洗涤条带 3 次,每次 15 min,加入二抗室温下孵育 4 h,洗涤,ECL 显影。应用 Image J 软件分析条带灰度值,计算蛋白相对表达量。

1.10 统计分析 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,计量数据用均值±标准差表示,组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD- t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

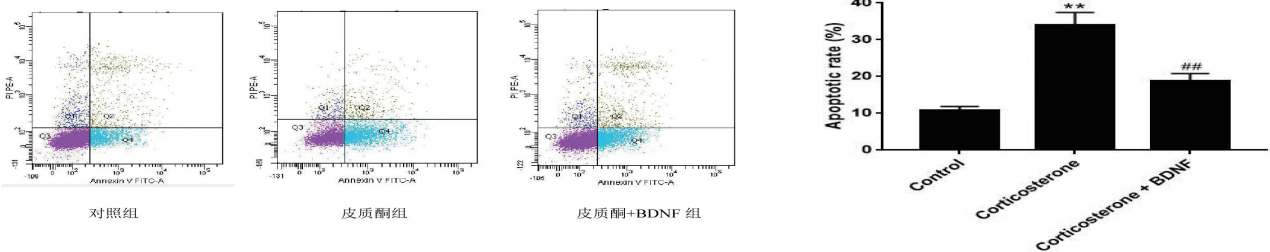
2.1 海马神经元形态学观察及鉴定 显微镜下观察发现,神经元培养 7 d 后,胞体及轴突明显,树突棘纵横交错,相互交织成丰富的神经网络。经 NSE 鉴定后发现,神经元纯度达到 92%以上。结果见图 1。

33258 荧光染色结果发现,对照组神经元形态正常,分布均匀,荧光呈暗色,说明无明显的凋亡特征;在皮质酮干预细胞 24 h 后,同一视野下细胞数目明显减少,细胞透亮,部分细胞核碎裂,呈现典型的凋亡形态学特征;而 BDNF 同时干预后,细胞形态基本恢复正常,细胞数量较皮质酮组有较明显的增加,说明 BDNF 能减缓皮质酮诱导的海马神经元凋亡。结果见图 4。



注:与皮质酮组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 2 不同浓度 BDNF 对海马神经元活力的影响



注:与对照组比较,* * $P<0.01$;与皮质酮组比较,## $P<0.01$ 。

图3 BDNF对皮质酮诱导海马神经元凋亡的影响

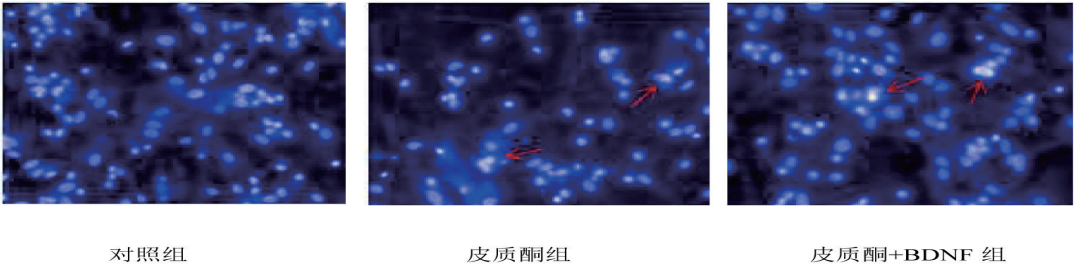


图4 BDNF对皮质酮诱导的海马神经元凋亡形态的影响

2.5 免疫印迹法检测凋亡蛋白表达 与对照组比较,皮质酮组神经元凋亡蛋白 Caspase-3、Caspase-9 表达显著上调($t_1=27.098$ 、 $t_2=24.311$,均 $P<0.01$);在给

予最佳剂量 BDNF(48 ng/ml)干预后,神经元 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达明显下降($t_1=17.341$ 、 $t_2=14.993$,均 $P<0.01$)。结果见图5、表1。



图5 各组细胞 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达结果

表1 BDNF对皮质酮诱导海马神经元凋亡蛋白表达的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	Caspase-3 相对表达量	Caspase-9 相对表达量
对照组	0.21±0.03	0.33±0.03
皮质酮组	0.89±0.08**	0.69±0.08**
皮质酮+BDNF组	0.41±0.03##	0.45±0.05##
F值	69.918	58.630
P值	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,* * $P<0.01$;与皮质酮组比较,## $P<0.01$ 。

3 讨论

皮质酮是动物体内主要的糖皮质激素,由HPA轴肾上腺所分泌,在机体受到应激时,伴随着体内内分泌紊乱及HPA轴亢进,皮质酮水平较正常状态下有明显升高^[6]。高浓度的皮质酮能激活海马等部位的糖皮质激素受体,诱导神经元凋亡,在抑郁症、精神分裂症等脑部疾病中,皮质酮含量均有显著上升^[7]。目前,国内外许多报道采用皮质酮干预的方法建立应激动物模型或体外模拟应激状态,本研究参照文献方法,采用100 μM的皮质酮干预海马神经元,发现神经元凋亡明显,说明皮质酮诱导的海马神经元损伤模型建立成功。

BDNF是神经营养因子家族的关键成员,具有调

节神经元生长分化,促进神经元存活、增殖及发育等功能,并且能修复受损神经以及促进神经再生^[8-9]。BDNF分泌不足或功能下调会引起海马神经元发生形态及功能上的改变而导致脑损伤的发生^[10]。目前,临床上通常采用BDNF治疗脑瘫、脑卒中和阿尔兹海默症等脑损伤疾病,发挥其神经保护作用^[11]。本研究采用不同浓度的BDNF作用于皮质酮导致的受损海马神经元,发现其在1 ng/ml时就具有神经保护作用,通过统计分析发现,BDNF浓度为48 ng/ml时能对皮质酮介导的神经元损伤的拮抗作用最强。

海马神经元凋亡是导致认知障碍的重要原因^[12-13]。本研究采用流式细胞术和Hoechst染色两种经典的细胞凋亡检测方法,发现皮质酮干预后,神经元凋亡率显著上升,胞体透亮,部分细胞核碎裂,凋亡特征明显,同时细胞凋亡过程中最关键的执行蛋白-Caspase-3和Caspase-9的表达显著上调;BDNF则能有效逆转这一趋势,使细胞凋亡率下降,细胞形态基本恢复正常,凋亡蛋白Caspase-3和Caspase-9表达下调,说明BDNF能有效拮抗皮质酮诱导的海马神经元凋亡,发挥保护神经细胞的作用。本研究明确了BD

艾滋病严重疾病期合并中性粒细胞减少症与再感染的关系

陆鹏, 莫让辉, 梁柱石

梧州市第三人民医院, 广西 梧州 543001

摘要: 目的 研究艾滋病严重疾病期患者接受抗病毒治疗 (HAART) 前后中性粒细胞减少症与发生机会性感染的关系。

方法 回顾性分析 138 例已经确诊为艾滋病严重疾病期的患者, 所有患者的机会性感染均已得到控制而进入机会性感染的二级预防及 HAART 阶段。患者按 HAART 前基线的血常规检测, 分为中性粒细胞绝对数 $\leq 2 \times 10^9/L$ 组 77 例 (低下组) 和中性粒细胞绝对数 $> 2 \times 10^9/L$ 组 61 例 (正常组)。接受 HAART 6 个月后, 对比两组患者再感染率及平均抗生素使用天数, 分析患者基线中性粒细胞计数水平与抗生素使用天数、再感染次数的相关性。 **结果** 经过 6 个月的观察, 低下组患者的再感染率为 59.7%, 正常组患者的再感染率为 34.4%, 两者差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.732, P < 0.05$)。患者的基线中性粒细胞数值与患者再感染次数存在负相关 ($r_s = -0.31, P < 0.05$), 与抗生素使用天数存在负相关 ($r_s = -0.299, P < 0.05$)。 **结论** 合并中性粒细胞减少症可使艾滋病严重疾病期患者在抗病毒治疗早期出现再感染的危险性增加, 监测患者中性粒细胞水平, 及时发现并治疗再感染, 具有重要临床意义。

关键词: 艾滋病严重疾病期; 中性粒细胞减少症; 关系; 再感染

中图分类号: R512.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2019)06-0703-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.06.017

Relationship between severe-stage AIDS complicated with neutropenia and reinfection

LU Peng, MO Rang-hui, LIANG Zhu-shi

The Third People's Hospital of Wuzhou City, Wuzhou, Guangxi 543001, China

作者简介: 陆鹏 (1980-), 男, 广西人, 主治医师, 研究方向: 艾滋病临床诊疗。

NF 对皮质酮诱导海马神经元凋亡的保护作用, 但该作用具体机制尚不明确, 是否与调控神经元上糖皮质激素受体的表达有关, 尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 郭燕春. 针刺对新生大鼠缺血缺氧性脑损伤皮层神经营养因子及受体基因表达的影响[D]. 汕头: 汕头大学, 2007.
- [2] 邓笑梅, 龙隽, 孙琴, 等. 氧化应激与新生儿脑损伤[J]. 中国新生儿科杂志, 2010, 25(1): 50-52.
- [3] Ebada ME, Latif LM, Kendall DA, et al. Corticosterone protects against memory impairments and reduced hippocampal BDNF levels induced by a chronic low dose of ethanol in C57BL/6J mice[J]. Rom J Morphol Embryol, 2014, 55(4): 1303-1316.
- [4] Jiang P, Dang RL, Li HD, et al. The impacts of swimming exercise on hippocampal expression of neurotrophic factors in rats exposed to chronic unpredictable mild stress[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014; 729827.
- [5] 董海影, 张春, 弓箭, 等. 芍药苷对大鼠皮质酮损伤的海马神经元 TrkB/BDNF 信号通路的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(22): 5499-5501.
- [6] Koe AS, Salzberg MR, Morris MJ, et al. Early life maternal separation stress augmentation of limbic epileptogenesis: the role of corticosterone and HPA axis programming[J]. Psychoneuroendocrinology, 2014, 42: 124-133.
- [7] Wu TC, Chen HT, Chang HY, et al. Mineralocorticoid receptor antag-

onist spironolactone prevents chronic corticosterone induced depression-like behavior[J]. Psychoneuroendocrinology, 2013, 38(6): 871-873.

- [8] Wang S, Li X, Li M, et al. Cystamine attenuated behavioral deficiency via increasing the expression of BDNF and activating PI3K/Akt signaling in 2,5-hexanedione intoxicated rats[J]. Toxicol Res, 2016, 6(2): 199-204.
- [9] 余青龙, 任娟, 周奇卿. 血清 SAA、BDNF、ALP 水平与脑卒中后并发血管性认知功能障碍的关系[J]. 实用预防医学, 2018, 25(5): 565-568.
- [10] Angelucci F, Aloe L, Vasquez PJ. Mapping the differences in the brain concentration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in an animal model of depression[J]. Neuroreport, 2000, 11(6): 1369-1373.
- [11] 江东, 于建云. 脑源性神经营养因子临床研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2011, 27(2): 221-225.
- [12] Zhang B, Zhang JW, Wang WP, et al. Effect of lamotrigine on epilepsy-induced cognitive impairment and hippocampal neuronal apoptosis in pentylenetetrazole-kindled animal model[J]. Synapse, 2017, 71(2): 21945.
- [13] 杜森, 夏春波, 叶琳, 等. 大鼠海马认知障碍对糖脂代谢的影响及其与海马神经元凋亡的关系[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(4): 1000-1002.

收稿日期: 2018-10-09