·基础研究·

孤独症鼠模型海马区脑源性神经营养因子-酪氨酸激酶受体B通路的动态变化研究*

周玉楠[1] 姜志梅[1,2]

摘要

目的：探究孤独症模型鼠海马区脑源性神经营养因子（brain derived neurotrophic factor，BDNF）-酪氨酸激酶受体B（tyrosine kinase receptor B，TrkB）通路在不同时间点的动态表达情况，为孤独症发病机制和临床治疗的研究提供思路。

方法：随机选取孕12.5天Wistar雌鼠24只，实验组12只腹腔注射丙戊酸钠，对照组12只腹腔注射生理盐水。分别对两组雌鼠生产的仔鼠进行行为学检测。于仔鼠P7、P21、P28、P35、P42时，从实验组和对照组中随机各取8只，采用Western Blot对两组仔鼠海马区BDNF和TrkB蛋白表达进行检测，采用Rt-PCR对两组仔鼠海马区BDNF和TrkB的mRNA表达进行检测。

结果：与对照组仔鼠相比，实验组仔鼠存在以下异常：①行为学方面：社会交流能力下降，重复性刻板行为增加，学习记忆能力下降，以上差异均有显著性意义（$P<0.05$）。②Western Blot检测：在P7、P21、P28时，实验组仔鼠海马区BDNF和TrkB蛋白表达都高于对照组（$P<0.05$），而在P35、P42时，实验组仔鼠海马区BDNF和TrkB蛋白表达低于对照组（$P<0.05$）。③Rt-PCR检测：在P7、P21、P28时，实验组仔鼠海马区BDNF和TrkB的mRNA表达都高于对照组（$P<0.05$），而在P35、P42时，实验组仔鼠海马区BDNF和TrkB的mRNA表达低于对照组（$P<0.05$）。

结论：孤独症模型鼠海马区BDNF-TrkB通路早期过度表达，后期表达下降，且此改变在转录水平就已发生。

关键词 孤独症；脑源性神经营养因子；酪氨酸激酶受体B；海马

中图分类号：R493，R749 **文献标识码**：A **文章编号**：1001-1242(2022)-07-0882-05

Dynamic changes of BDNF-TrkB pathway in hippocampus of autism rat model/ZHOU Yunan, JIANG Zhimei//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2022, 37(7):882—886

Abstract

Objective: To provide ideas for the study of the pathogenesis of autism spectrum disorders by exploring the dynamic expression of BDNF-TrkB pathway in hippocampus of autism model rats at different time points.

Method: Twenty-four female Wistar rats on day 12.5 of pregnancy were randomly selected. 12 rats in the experimental group were intraperitoneally injected with VPA and 12 rats in the control group were intraperitoneally injected with normal saline. The behavior of the offspring of the two groups were detected. At the time of P7, p21, P28, p35 and p42. The expression of BDNF and TrkB protein was detected by Western Blot and the mRNA expression of BDNF and TrkB was detected by RT-PCR.

Result: When compared with the offspring of the control group, the following abnormalities were found in the offspring of the model group: ①Behavior: social communication ability and learning and memory ability decreased, while repetitive stereotyped behavior increased. The above differences were statistically significant ($P<0.05$). ②Western Blot analysis: at P7, p21, P28, the expression of BDNF and TrkB protein in hippocampus of model group was higher than that of the control group ($P<0.05$), while at p35 and p42, the expression of

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.07.003

*基金项目：佳木斯大学博士专项科研基金启动项目（JMSUZB2018-03）；佳木斯大学优秀学科团队项目(JDXKTD-2019006)

1 佳木斯大学康复医学院，黑龙江佳木斯市，154007；2 通讯作者

第一作者简介：周玉楠，女，硕士研究生； 收稿日期：2020-11-12

BDNF and TrkB protein in hippocampus of the model group was lower than that of the control group($P<0.05$). ③RT-PCR detection: at P7, p21, P28, the mRNA expression of BDNF and TrkB in hippocampus of the model group was higher than that of the control group ($P<0.05$), but at p35 and p42, the mRNA expression of BDNF and TrkB in hippocampus of the model group was lower than that of the control group($P<0.05$). **Conclusion**: The expression of BDNF TrkB pathway in hippocampus of autism model rats is over expressed in the early stage and decreased in the later stage, and this change has appeared at the transcriptional level.

Author's address The Rehabilitation Medical College of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang, 154007

Key word autism; brain derived neurotrophic factor ; TrkB; the hippocampus

孤独症(autism spectrum disorders, ASD)是一组以社会交往障碍,言语和非言语交流障碍,狭隘兴趣、刻板行为为主要特征的神经发育障碍性疾病[1]。美国疾病控制与预防中心最新报道,美国8岁儿童ASD患病率为1/54[2]。ASD的病因不明确,因此,对ASD的细胞信号传导通路的研究对其发病机制的探索具有重要意义。脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)是一种被广泛研究的神经营养因子,对神经元的分化、存活、生长发育都起到重要作用。酪氨酸激酶受体B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)是BDNF的主要功能受体,BDNF与TrkB结合后能够激活多个重要的信号传导通路并发挥其生物效应[3]。本研究通过对ASD模型鼠海马区BDNF-TrkB通路表达的动态检测,探究ASD发病机制,为其临床治疗提供思路。

1 材料与方法

1.1 模型制备

健康成年Wistar大鼠(购于辽宁长生生物技术股份有限公司),雌性24只(体重:220—250g),雄性12只(体重:280—300g)。于佳木斯大学实验动物中心,按清洁级饲养标准饲养。以雌雄2∶1比例于晚上7点合笼,次日早晨7点行阴道涂片检查,观察到精子记为妊娠第1天。于雌鼠孕12.5天时,随机选取12只孕鼠腹腔注射VPA(600mg/kg, VPA按250g/L溶于生理盐水中),孕鼠所产仔鼠为孤独症实验组,共娩出实验组仔鼠109只。随机选取12只孕鼠腹腔注射同等剂量生理盐水,孕鼠所产仔鼠为对照组,共娩出对照组仔鼠131只。

1.2 行为学检测

1.2.1 社会交流测试:于28日龄时将仔鼠置于60cm×60cm×40cm的观察箱,箱内保持洁净无干扰气味,分别将饱含鼠尿、生理盐水和酒精的棉签置于距箱底10cm高的位置,保证仔鼠可以嗅到棉签。每种液体更换3支棉签,重复3次。记录仔鼠嗅每种液体所用平均时间。

1.2.2 重复刻板行为检测:于28日龄时将仔鼠单独置于48cm×24cm×20cm的长方形实验盒,实验盒侧壁装有束状红外线发生器和探测器,利用仔鼠是否阻断红外线而自动检测并记录其活动情况。保持周围环境安静,分别记录仔鼠30min内转圈、跳跃和梳理毛发的累计时间。

1.2.3 学习记忆能力检测:仔鼠于28日龄进行水迷宫测试。水迷宫是一个直径150cm,高50cm的黑色圆形水池。水池平均分为SW、NW、SE和NE四个象限,逃生平台固定置于泳池一个象限的中心,距泳池边缘15cm且低于水面1cm。连接于显示系统的摄像机记录被测仔鼠的运动轨迹。定位航行实验:将仔鼠置于水迷宫的其中一个象限,测量仔鼠逃避潜伏期,即从仔鼠入水开始到爬上平台的时间。若仔鼠60s内找到逃生平台,则将其从池中移出;若仔鼠60s内未找到逃生平台,人为引导其爬上平台,并允许仔鼠重新定向至远端视觉提示20s。连续训练5天后记录两组仔鼠的逃避潜伏期时间。空间探索实验:于最后一次训练结束的24h后进行,撤掉水池中的逃生平台,将目标象限设置为原来放置逃生平台的象限,将仔鼠随机放置于除目标象限外的其他3个象限内,记录两组仔鼠60s内穿越目标象限的次数。

1.3 BDNF和TrkB的蛋白表达检测

于仔鼠P7、P21、P28、P35、P42时,随机选取两组仔鼠各8只,分离海马组织,加入RIPA裂解液后匀浆,冰浴30min,12000r/min离心10min,收集上清液,按照4∶1比例加入蛋白上样缓冲液,沸水浴变性15min,收入-20℃冰箱保存备用。将样品加入电泳

孔中，当指示剂到达距分离胶下缘约0.5cm处时断开电源，取出胶板。将胶置于转移缓冲液中放置15min后，按负极→海绵→5层滤纸→胶→PVDF膜→5层滤纸→海绵→正极的顺序固定于电转仪中，200mA转膜1h。将PVDF膜于脱色摇床上，5%脱脂牛奶封闭1h。将条带分别置于一抗溶液中，4℃孵育过夜，TBST洗膜3次。二抗溶液中，室温孵育1h，TBST洗膜3次。将条带置于显影剂中，拍照后计算各组不同蛋白的表达。

1.4 BDNF和TrkB的mRNA表达检测

于仔鼠P7、P21、P28、P35、P42时，随机选取两组仔鼠各8只，处死后取海马组织匀浆，12000r/min离心10min，重复3次，制得RNA溶液。将RNA溶液中加入oligo（dT）18，置于PCR仪上65℃保温5min，迅速置冰上冷却后，依次加入buffer、10mM dNTPs、RNA inhibitor和反转录酶。置于PCR仪上42℃保温60min后，80℃保温5min灭活反转录酶。进行PCR扩增，95℃预变性10min后，95℃变性15s，60℃变性60s，进行40次循环。结果采用半定量分析法，用$2^{-\Delta\Delta CT}$表示。BDNF和TrkB的引物序列见表1。

表1 BDNF和TrkB的引物序列

引物名称	引物序列（5'-3'）	片段长度（bp）	退火温度（℃）
R-GAPDH-S	CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138	60
R-GAPDH-A	GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	138	60
R-BDNF-S	GTGTGACAGTATTAGCGAGTGGG	221	60
R-BDNF-A	ACGATTGGGTAGTTCGGCATT	221	60
R-TrkB-S	ACCAATCACACGGAGTACCAC	217	60
R-TrkB-A	TATCCCCGATGTCAGTTGGC	217	60

1.5 统计学分析

用SPSS26.0统计软件进行数据录入及分析，所有数据均采用均数±标准差表示。正态性检验采用夏皮洛威尔克检验法；两组均数比较采用*t*检验。

2 结果

2.1 行为学检测

2.1.1 社会交流能力：实验组仔鼠嗅生理盐水、酒精、鼠尿的时间显著长于对照组（$P<0.05$）。见表2。

2.1.2 重复刻板行为：实验组仔鼠的蹦跳、转圈和理毛动作累计时间长于对照组（$P<0.05$）。见表3。

2.1.3 学习记忆能力：实验组仔鼠逃避潜伏期时间显著长于对照组（$P<0.05$）；实验组仔鼠穿越目标象限次数显著少于对照组（$P<0.05$）。见表4。

2.2 两组仔鼠海马区BDNF、TrkB蛋白表达

2.2.1 不同日龄两组仔鼠的BDNF蛋白表达：P7、P21、P28时，实验组仔鼠海马区BDNF蛋白表达显著高于对照组（$P<0.05$）；而P35、P42时实验组仔鼠海马区BDNF蛋白表达显著低于对照组（$P<0.05$）。见表5，图1。

2.2.2 不同日龄两组仔鼠的TrkB蛋白表达：P7、P21、P28时，实验组仔鼠海马区TrkB蛋白表达显著高于对照组（$P<0.05$）；而P35、P42时实验组仔鼠海

表2 两组仔鼠社会交流能力比较 （$\bar{x}\pm s$）

项目	例数	对照组（s）	实验组（s）	*t*值	*P*值
生理盐水	8	8.01±1.39	11.47±1.9	-4.168	0.001
酒精	8	5.43±1.39	7.31±1.87	-2.285	0.038
鼠尿	8	11.61±2.69	21.59±2.98	-7.021	0.000

表3 两组仔鼠重复刻板行为累计时间比较 （$\bar{x}\pm s$）

项目	例数	对照组（s）	实验组（s）	*t*值	*P*值
转圈	8	162.06±4.16	235.94±3.52	-38.367	0.000
蹦跳	8	175.94±3.42	260.85±16.12	-14.57	0.000
理毛	8	175.74±3.14	276.25±6.07	-41.566	0.000

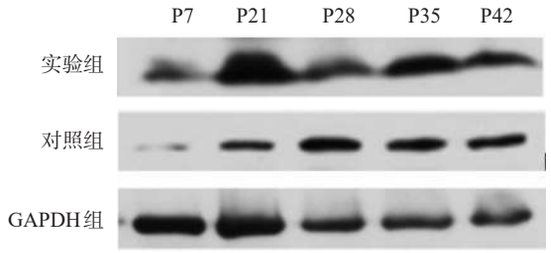
表4 两组仔鼠学习记忆能力比较 （$\bar{x}\pm s$）

项目	例数	对照组	实验组	*t*值	*P*值
逃避潜伏期时间（s）	8	12.98±2.16	21.63±2.86	-6.825	0.000
穿越目标象限次数	8	5.63±2.5	2.38±1.51	3.146	0.007

表5 两组仔鼠BDNF蛋白表达 （$\bar{x}\pm s$）

项目	例数	对照组（g）	实验组（g）	*t*值	*P*值
P7	8	0.34±0.11	1.38±0.13	-15.531	0.000
P21	8	0.54±0.15	1.23±0.14	-8.193	0.000
P28	8	0.71±0.16	1.12±0.16	-4.498	0.001
P35	8	1.04±0.11	0.72±0.13	4.521	0.001
P42	8	1.12±0.18	0.62±0.13	5.550	0.000

图1 两组仔鼠海马区BDNF蛋白表达



马区TrkB蛋白表达显著低于对照组(P<0.05)。见表6,图2。

2.3 两组仔鼠海马区BDNF、TrkB的mRNA表达

2.3.1 不同日龄两组仔鼠BDNF的mRNA表达:P7、P21、P28时,实验组仔鼠海马区BDNF的mRNA表达显著高于对照组(P<0.05);而P35、P42时实验组仔鼠海马区BDNF的mRNA表达显著低于对照组(P<0.05)。见表7。

2.3.2 两组仔鼠不同日龄TrkB的mRNA表达:P7、P21、P28时,实验组仔鼠海马区TrkB的mRNA表达显著高于对照组(P<0.05);而P35、P42时实验组仔鼠海马区TrkB的mRNA表达显著低于对照组(P<0.05)。见表8。

图2 两组仔鼠海马区TrkB蛋白表达

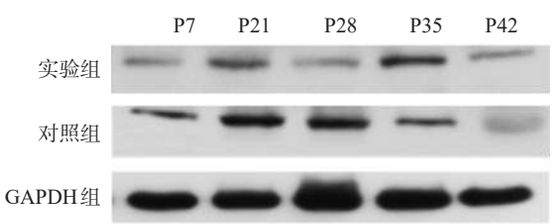


表6 两组仔鼠TrkB蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$)

项目	例数	对照组(g)	实验组(g)	t值	P值
P7	8	0.20±0.02	1.13±0.54	- 4.28	0.008
P21	8	0.51±0.10	0.91±0.14	- 5.750	0.000
P28	8	0.63±0.09	0.83±0.19	- 2.359	0.049
P35	8	0.84±0.12	0.58±0.02	5.095	0.003
P42	8	0.97±0.05	0.50±0.10	10.922	0.000

表7 两组仔鼠BDNF的mRNA表达 ($\bar{x}\pm s$)

项目	例数	对照组(g)	实验组(g)	t值	P值
P7	8	1.00±0.00	2.51±0.15	- 25.137	0.000
P21	8	1.20±0.19	2.27±0.12	- 11.596	0.000
P28	8	1.47±0.13	1.93±0.17	- 5.439	0.000
P35	8	1.78±0.11	1.53±0.15	3.287	0.008
P42	8	2.02±0.16	1.29±0.14	8.323	0.000

表8 两组仔鼠TrkB的mRNA表达 ($\bar{x}\pm s$)

项目	例数	对照组(g)	实验组(g)	t值	P值
P7	8	0.32±0.13	1.13±0.54	- 3.630	0.013
P21	8	0.5±0.13	1.12±0.15	- 7.598	0.000
P28	8	0.68±0.14	0.98±0.2	- 3.031	0.013
P35	8	1.14±0.11	0.65±0.16	5.976	0.000
P42	8	1.23±0.12	0.54±0.15	8.987	0.000

3 讨论

ASD的病因至今仍不明确,对ASD信号传导通路方面的研究对其发病机制的探索具有重要意义。BDNF通过突触加强信号的传递,特别是在海马神经元中含量丰富,使得其对信号传递作用更加明显[4—5]。近年来,已有学者对BDNF、TrkB在孤独症鼠模型中的改变做过相关研究,但是,并没有探究其动态变化规律的研究。Sadakata等[6]研究发现,在Cadps2基因敲除小鼠中,同时表现出BDNF释放受损的细胞改变和类似孤独症样的行为表型。CADPS2基因位于染色体7q上的孤独症易感性位点1。因此,BDNF在ASD的发生和发展中起到重要作用,研究BDNF及其受体TrkB在ASD中的改变,有助于更好的了解ASD的发病机制。前人对BDNF在孤独症鼠模型中的研究显示,在Mecp2突变型孤独症模型鼠中,Chang等[7]提取了全脑的BDNF蛋白,发现在仔鼠6—8周时,BDNF蛋白水平下降为野生型对照组的69%。但是,在Fmr1敲除小鼠模型中,Uutela等人却发现,与野生型对照组相比,仔鼠幼年时期脑内海马区BDNF表达广泛增加[8]。对BDNF-TrkB通路的研究显示,14日龄的D2多巴胺受体基因敲除的孤独症模型鼠,脑内背侧纹状体中BDNF和TrkB蛋白表达均降低[9]。由此可见,在不同时期,BDNF-TrkB通路在ASD模型鼠脑内的改变并不相同。

本研究采用在雌鼠孕12.5天时,腹腔注射丙戊酸钠盐溶液的经典造模方式。对模型鼠通过社会交流能力测试、刻板行为测试、水迷宫实验进行评估,结果显示仔鼠存在社会交流缺陷、重复性刻板行为增加、学习记忆能力较差等情况。以上实验中仔鼠在行为学方面的结果,与Schneider、Banerjee和Reynolds等的研究结果一致[10—12],说明本实验孤独症鼠模型建立成功。同时,本研究为探索BDNF及其受体TrkB在ASD中的动态变化规律,在仔鼠发育的关键时期,选取5个不同的时间点(P7日龄仔鼠脑发育水平相当于人类足月出生第一天的婴儿,P21—P42为仔鼠从断奶到青春期的日龄[13]。),检测该通路在仔鼠海马区的改变,蛋白检测结果显示:在P7、P21、P28时,实验组仔鼠脑内BDNF和TrkB的表达均高于对照组;而在P35、P42时,实验组仔鼠脑

内BDNF和TrkB的表达均低于对照组，即模型鼠海马区BDNF和TrkB蛋白早期过度表达，后期表达减少。为了探寻此异常表达的原因，本研究还对其mRNA的表达进行了检测，结果显示：在P7、P21、P28时，实验组仔鼠海马区BDNF和TrkB的mRNA表达高于对照组；而在P35、P42时，实验组仔鼠海马区BDNF和TrkB的mRNA表达低于对照组。即BDNF和TrkB的mRNA早期表达过度，后期表达减少。由此可知，BDNF-TrkB通路在孤独症模型鼠海马区早期过度表达，后期表达减少，且此改变在转录时就已发生，但导致该改变的具体原因，还有待后续的深入研究。

总之，本研究探索了BDNF-TrkB通路在孤独症模型鼠在不同日龄海马区的动态变化，为ASD发病机制的研究及后续临床的治疗提供思路。

参考文献

[1] American Psychiatric Association (APA) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)[M]. Washington DC：Pilgrim Press，2013.

[2] Mary P，Monica D，Deborah L，et al. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years-autism and developmental disabilities monitoring network，11 sites，United States，2016[J]. MMWR，2020，69(4)：1—12.

[3] Klein R，Nanduri V，Jing S，et al. The TrkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3[J]. Cell，1991，66(2)：395—403.

[4] Kang H，Schuman M. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus [J]. Science，1995，267：1658—1662.

[5] Piepmeier T，Etnier L. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a potential mechanism of the effects of acute exercise on cognitive performance[J]. J. Sport Heal Sci，2015，4：14—23.

[6] Sadakata T，Washida M，Iwayama Y，et al. Autistic-like phenotypes in Cadps2-knockout mice and aberrant CADPS2 splicing in autistic patients[J]. J Clin Invest，2007，117：931—943.

[7] Chang Q，et al. The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression[J]. Neuron，2006，49(3)：341—348.

[8] Uutela，M，et al. Reduction of BDNF expression in Fmr1 knockout mice worsens cognitive deficits but improves hyperactivity and sensorimotor deficits[J]. Genes Brain Behav，2012，11(5)：513—523.

[9] Lee Y，Han L. Early-life stress in D2 heterozygous mice promotes autistic-like behaviors through the downregulation of the BDNF-TrkB pathway in the dorsal striatum[J]. Exp Neurobiol，2019，28(3)：337—351.

[10] Schneider T，Przewlocki R. Behavioral alterations in rat sprenatally exposed to valproic acid：animal model of autism[J]. Neuropsychopharmacology，2005，30(1)：80—89.

[11] Banerjee A，Engineer CT，Sauls BL，et al. Abnormal emotional learning in a rat model of autism exposedto valproic acid in utero[J]. Front Behav Neurosci，2014，8(6)：378—390.

[12] Reynolds S，Millette A，Devine DP. Sensory and motor characterization in the postnatal valproate rat model of autism[J]. Dev Neurosci-Basel，2012，34(3)：258—267.

[13] Sulagna D，Pallav S. Men and mice：Relating their ages [J]. Life Sciences，2016，152：244—248.