

大鼠气道损伤后脑源性神经营养因子表达变化^{*}

袁 兵¹, 杨瑞安¹, 赵 伟¹, 许彦彦¹, 但齐琴², 张云辉^{1△}

1. 云南省第一人民医院 呼吸内科(昆明 650000); 2. 四川大学华西医院 神经疾病研究室(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨丙烯醛吸入损伤对大鼠气道脑源性神经营养素(BDNF)表达的影响。**方法** 用丙烯醛雾化吸入造成成年雄性健康大鼠气道黏液高分泌损伤模型,损伤后不同时间点(1周、3周和6周各11只)取气管上皮,以生理盐水雾化吸入为对照(1、3、6周各11只)。用免疫组化和原位杂交染色检测 BDNF 蛋白和 mRNA 的定位分布,RT-PCR 检测气道 BDNF mRNA 不同时间点的表达变化。**结果** 气管上皮和平滑肌可见 BDNF 阳性细胞,胞浆染色。RT-PCR 显示与对照组相比,丙烯醛吸入1周气管中 BDNF mRNA 表达明显上调($P<0.05$),随后逐渐回落,到第3周回到对照组水平,持续至第6周(P 均 >0.05)。**结论** 丙烯醛吸入致大鼠气道损伤过程中,气管上皮和平滑肌 BDNF 表达早期明显上调,提示 BDNF 参与了气道损伤过程中神经源性炎症反应调控。

【关键词】 丙烯醛吸入 气道损伤 BDNF 大鼠

Changes of the Expression of Brain Derived Neurotrophic Factors in Rats Trachea Induced by Acrolein Exposure

YUAN Bing¹, YANG Rui-an¹, ZHAO Wei¹, XU Yan-yan¹, DAN Qi-qin², ZHANG Yun-hui^{1△}. 1. Department of Respiration, the First Affiliated Hospital of Yunnan Province, Kunming 650000, China; 2. Institute of Neurological Disease, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

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

【Abstract】 Objective To investigate expressional changes of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the trachea of rats with acrolein inhalation. **Methods** Twenty two SD rats were divided into 2 groups: the rats in experimental group were subjected to acrolein inhalation for the induce of trachea inflammatory injury, while the rats with saline (NS) inhalation were as control. All the rats were sacrificed in 1,3,6 weeks after acrolein ($n=11$ at each time point) or saline inhalation ($n=11$ at each time point), the samples of trachea epithelium were harvested. The immunohistochemistry and in situ hybridization was performed to detect the location of BDNF protein and mRNA in trachea. The expression of BDNF mRNA in the trachea tissues were determined by RT-PCR. **Results** There are positive cells in epithelium of trachea for BDNF protein and mRNA, with cytoplasm staining. The expression of BDNF mRNA in the trachea was increased at 1 week after acrolein inhalation ($P<0.05$, vs. control group), then decreased along with the time and reached to the same level as control group at 3 weeks, then last to 6 weeks ($P>0.05$). **Conclusion** The inflammatory injury in trachea induced by acrolein exposure could be associated with the increased expression of BDNF. BDNF may be one of the crucial inflammatory factors in the process of inflammatory reaction in trachea with acrolein stimulation.

【Key words】 Acrolein inhalation Trachea injury BDNF Rats

丙烯醛是化学性质活泼的水溶性化合物,机体接触并吸入后大部分滞留在直接侵入部位,可刺激支气管黏膜和肌层,使黏蛋白大量生成^[1],从而导致呼吸道损伤及肺部炎症^[2],因此能部分模拟慢性阻塞性肺疾病症状。研究表明,大鼠持续吸入丙烯醛后可引起呼吸道吸入性损伤,气道内可出现巨噬细胞聚集、上皮损害、黏液高分泌等病理表现^[3,4]。脑源性神经营养素(brain derived neurotrophic factor, BDNF)主要在中枢神经系统表达。免疫组

织化学研究发现,BDNF 免疫阳性神经元分布于各脑区,包括大脑皮质、海马、基底前脑、纹状体、丘脑、脑干和小脑,其中以海马和皮层中的含量最高^[5,6],其功能主要是促进神经元的存活和突起生长。研究表明,大脑和脊髓损伤后 BDNF mRNA 表达显著增加,且其特异性受体 TrkB 的表达亦增多,受体时空分布与 BDNF mRNA 相对应^[7,8]。近年发现,BDNF 在外周非神经组织亦有表达。心、肺、骨骼肌、毛发、膀胱、结肠及内耳等非神经组织均有 BDNF 分布,尤其在肺、膀胱及结肠中 BDNF 浓度甚至高于大脑或皮肤^[9],提示 BDNF 在非神经组织具有重要作用^[10,11]。在免疫系统,BDNF 可由免疫

* 云南省自然科学基金(No. 2011FZ272, No. 2013FZ264)资助

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

炎性细胞产生并作用于免疫炎性细胞,与免疫反应有关^[12]。既往研究已报道吸入丙烯醛可导致肺损伤,并引起肺内炎症介质释放和炎性细胞募集^[13],但没有研究丙烯醛所致大鼠气道损伤致气道黏液高分泌过程中BDNF的表达变化。本实验拟检测BDNF在丙烯醛吸入性气道损伤大鼠气管中的变化,为慢性阻塞性肺疾病的防治提供新的分子实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

免疫组化染色试剂盒(北京中杉生物),BDNF抗体(Chemicon),原位杂交试剂盒(Roche),Trizol试剂(Invitrogen),RT-PCR试剂盒(TaKaRa),焦碳酸二乙酯(Sigma),DAB显色试剂盒(北京中杉生物),丙烯醛(成都长征化纤有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型构建和动物分组 成年雄性健康SD大鼠,体质量200~220 g,购自昆明医科大学实验动物中心。实验前适应性喂养1周。将大鼠随机分为2组:即生理盐水雾化吸入对照组和丙烯醛吸入模型组。每组又分1周、3周和6周3个时间点。每组每个时间点11只实验鼠。其中8只用于基因水平检测[逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)],3只用于蛋白(免疫组化)和基因(原位杂交)定位检测。用丙烯醛雾化吸入制备大鼠气道损伤模型。具体方法为:SD大鼠雾化吸入3 mg/L丙烯醛每次3 h,每天两次,持续6周,建立大鼠气道炎症和黏液高分泌动物模型。分别于丙烯醛吸入后第1周、第3周、第6周3个时间点处死大鼠。

1.2.2 取材及样品制备 1 mg/mL戊巴比妥钠按50 mg/kg剂量腹腔注射麻醉实验鼠,将大鼠固定于操作台上,股动脉放血致死。取出支气管,免疫组化和原位杂交样本用4%(体积分数)多聚甲醛后固定。RT-PCR样本未固定直接用于提取总RNA,然后用于RT-PCR分析。

1.2.3 免疫组织化学检测 将固定的气管组织制成30 μ m厚冰冻切片,用0.1 mol/L PBS洗涤5 min $\times$ 3次,3 mL/L过氧化氢室温封闭30 min以阻断内源性氧化酶,再用PBS液洗5 min $\times$ 3次;2%羊血清37 $^{\circ}$ C温箱湿盒内孵育20 min进行封闭;滤纸吸干后分别滴加BDNF抗体(1:500),置于37 $^{\circ}$ C温箱湿盒内孵育30 min后,4 $^{\circ}$ C冰箱过夜。0.1 mol/L PBS液洗5 min $\times$ 3次后,加辣根过氧化

酶偶联的羊抗IgG(HRP/IgG)(1:200)二抗,37 $^{\circ}$ C孵育30 min;0.1 mol/L PBS液洗5 min $\times$ 3次后,DAB室温下显色;常规脱水,透明,封片。阴性对照用PBS代替一抗,其余步骤不变。于带照相设备的显微镜下采取免疫组化图像后,在200倍视野下观察BDNF蛋白免疫染色产物在气管的细胞定位与分布。

1.2.4 原位杂交检测 探针由TaKaRa公司合成。按试剂盒说明书和文献^[14]方法完成杂交信号的检测,NBT-BCIP 37 $^{\circ}$ C显色,常规脱水,透明,封片。在200倍视野下观察BDNF基因产物在气管的细胞定位与分布。

1.2.5 RT-PCR 参照文献^[15,16]方法和试剂盒说明书,用半定量RT-PCR检测气管组织中BDNF mRNA的表达。引物序列为:BDNF mRNA,上游5'-TCCCTGGCTGACACTTTT-3',下游5'-ATTGGGTAGTTTCGGCATT-3',扩增片段长度为466 bp; β -actin,上游5'-GTAAAGACCTCTATGCCAACA-3',下游5'-GGACTCATCGTACTCCTGCT-3',扩增片段长度为227 bp。由TaKaRa公司合成。采用Trizol试剂(每50 mg气管组织加1 mL Trizol)参照说明提取总RNA,紫外分光光度仪测定总RNA浓度。取4 μ g总RNA用逆转录试剂盒(两步法)逆转录为cDNA,以5 μ L cDNA作为模板进行扩增,上、下游引物各1 μ L,反应总体积为25 μ L。扩增条件:94 $^{\circ}$ C,5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s、52.5 $^{\circ}$ C退火30 s、72 $^{\circ}$ C延伸1 min,共30个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。取20 μ L PCR产物,10 g/L琼脂糖凝胶电泳,电压110 V,时间25 min。BIO-RAD凝胶成像仪紫外模式下拍摄凝胶图片,以 β -actin为内对照进行电泳条带光密度分析,求得各目的条带与 β -actin的相对比值进行半定量分析。

1.3 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析和 t 检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 BDNF蛋白和mRNA在气管中的定位分布与变化趋势

免疫组化染色和原位杂交均显示,BDNF阳性反应物主要出现在气管上皮细胞和平滑肌细胞,胞浆染色。BDNF染色深度在丙烯醛吸入后1周最强,而后至3周到6周减弱,接近对照水平。见图1、图2。

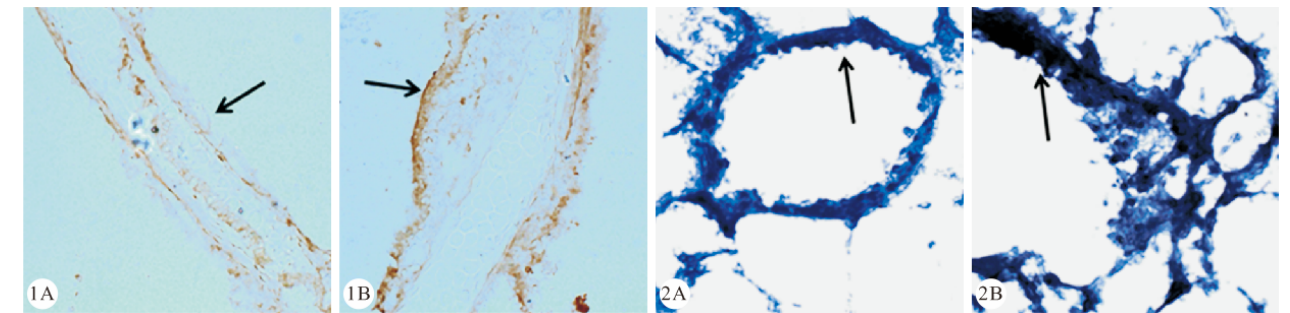


图 1 气管组织 1 周后 BDNF 免疫组化阳性染色(箭所示)。SP ×200

图 2 气管组织 1 周后 BDNF mRNA 原位杂交阳性染色(箭所示)。×200

Fig 1 Immunohistochemistry staining of BDNF in trachea at 1 week (arrow shows positive expression). SP ×200

Fig 2 In situ hybridization of BDNF mRNA in trachea (arrow shows positive expression). ×200

A: NS group; B: Acrolein inhalation group

2.2 BDNF mRNA 水平变化

RT-PCR 结果显示,对照组气道内各时间点均可检测到 BDNF mRNA 表达,各时间点间比较没有明显变化。丙烯醛吸入 1 周组气管 BDNF mRNA 较对照组升高($P<0.05$);3 周时降低,然后一直持续到 6 周,与对照组比较差异均无统计学意义。见附表、图 3。

附表 BDNF mRNA 在气管组织的表达水平($\bar{x}\pm s$)

Table The expression of BDNF mRNA in trachea ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	1 week	3 weeks	6 weeks
NS	11	0.580 0 $\pm$ 0.086 8	0.553 3 $\pm$ 0.101 1	0.611 2 $\pm$ 0.111 3
AI	11	0.778 3 $\pm$ 0.230 0*	0.682 5 $\pm$ 0.128 8	0.656 3 $\pm$ 0.178 1

* $P<0.05$, vs. NS group. AI: Acrolein inhalation

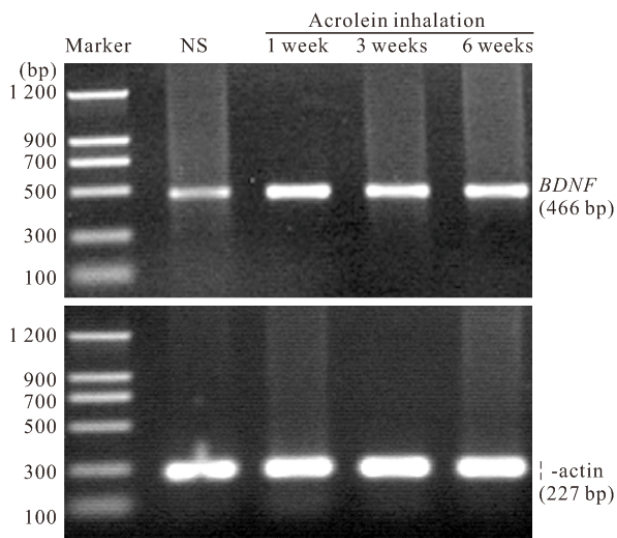


图 3 BDNF 基因电泳图

Fig 3 Agrose electrophorogram of BDNF gene

3 讨论

已知丙烯醛吸入刺激能导致大鼠气道损伤,并

出现明显的气道炎症和黏液高分泌表现^[17],而其分子机制不清楚。本实验通过大鼠气道损伤模型发现,气管上皮和平滑肌可见到 BDNF mRNA 和蛋白表达,且丙烯醛吸入 1 周气管内 BDNF mRNA 明显升高,3 周时回到对照组水平且一直持续到 6 周。提示丙烯醛雾化吸入致大鼠气道炎症及黏液高分泌中,BDNF 参与了丙烯醛致气道黏液高分泌过程中的炎性调控。该结果为研究慢性阻塞性肺疾病的发生机制提供了重要的实验依据。

文献显示,BDNF 在过敏反应中发挥重要作用。组织细胞的损伤反应常常伴有一定的修复过程,而炎症和敏化是基本现象。在此过程中,常有炎症因子和神经营养因子如 BDNF 增加^[18]。因此提示 BDNF 在气道炎症过敏反应中起重要作用。BDNF 发挥作用主要依赖于其特异性受体 TrkB,该受体广泛表达于细支气管、肺泡巨噬细胞、II 型肺泡上皮细胞等^[19]。此外,BDNF 还与低亲和性受体 p75 结合启动不同的效应^[20]。在高浓度氧造成的新生儿肺损伤过程中,高浓度氧可上调 BDNF mRNA 和蛋白的表达,干扰 NO-cGMP 信号,减少气道平滑肌细胞内 cAMP,进而上调胆碱能递质影响气道高反应性^[20]。在过敏性炎症模型小鼠中,卵白蛋白致敏或烟雾剂刺激后,可在鼠浸润的气道炎症细胞和支气管肺泡灌洗液检测到 BDNF,且长期烟雾剂刺激后 BDNF 蛋白水平也明显升高^[18]。研究人员还发现在哮喘发作过程中 BDNF 水平比健康对照组、吸入糖皮质激素治疗组明显升高,而控制哮喘发作使 BDNF 水平下降^[21]。上述研究均提示在气道过敏性炎症反应中 BDNF 参与了炎症反应调节,但并未确定 BDNF 的来源,即增加的 BDNF 究竟在哪一类

细胞合成, BDNF 是外源性运入还是在气管内合成仍不清楚。本实验通过免疫组化和原位杂交证明气管上皮细胞和平滑肌细胞可合成 BDNF mRNA 和蛋白, 说明丙烯醛致大鼠气道炎性损伤过程中, 气道上皮和平滑肌能产生内源性 BDNF, 即气道产生的 BDNF 可能在丙烯醛诱导的炎症反应中发挥作用。进一步通过 RT-PCR 发现, 丙烯醛吸入 1 周气管内 BDNF mRNA 明显升高, 而 3 周时回到对照组水平且一直持续到 6 周。提示 BDNF 参与了早期神经免疫反应, 而随机体对损伤反应的适应及逐渐修复, 炎症反应减轻, 因此 BDNF 表达下降, 并恢复到正常水平。

综上, 本实验证实了在丙烯醛吸入致大鼠气道损伤炎性反应初期气管上皮和平滑肌细胞中 BDNF 表达上升, 从而为了解丙烯醛致气道损伤后 BDNF 在过敏性免疫反应中的调控机制提供了重要的实验依据。

参 考 文 献

- Kehrer JH, Biswal SS. The molecular effects of acrolein. *Toxicol Sci*, 2000; 57(1): 6-15.
- Leikauf GD. Hazardous air pollutants and asthma. *Environ Health Perspect*, 2002; 110(Suppl 4): 505-526.
- Borchers MT, Wesselkamper S, Wert SE, *et al.* Monocyte inflammation augments acrolein-induced Muc5ac expression in mouse lung. *Am J Physiol*, 1999; 277(3 Pt 1): L489-L497.
- Borchers MT, Wesselkamper SC, Harris NL, *et al.* CD8(+) T cells contribute to macrophage accumulation and airspace enlargement following repeated irritant exposure. *Exp Mol Pathol*, 2007; 83(3): 301-310.
- Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, *et al.* Expression of brain derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, 1997; 78(2): 431-448.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, *et al.* Distribution of BDNF protein and mRNA in the normal adult rat CNS. *J Neurosci*, 1997; 17(7): 2295-2313.
- Griesbach GS, Hovda DA, Molteni R, *et al.* Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function. *Neuroscience*, 2004; 125(1): 129-139.
- Rostami E, Krueger F, Plantman S, *et al.* Alteration in BDNF and its receptors, full-length and truncated TrkB and p75(NTR) following penetrating traumatic brain injury. *Brain Res*, 2014; 1542: 195-205. doi: 10. 1016/j. brainres. 2013. 10. 047.
- Lommatzsch MA, Braun A, Mannsfeldt VA, *et al.* Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. Implications for paracrine and target-derived Neurotrophic functions. *Am J Pathol*, 1999; 155(4): 1183-1193.
- Tessarollo L. Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1998; 9(2): 125-137.
- Sariola H. The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci*, 2001; 58(8): 1061-1066.
- Vega JA, García-Suárez O, Hannestad J, *et al.* Neurotrophins and the immune system. *J Anat*, 2003; 203(1): 1-19.
- Leikauf GD, McDowell SA, Wesselkamper SC, *et al.* Pathogenomic mechanisms for particulate matter induction of acute lung injury and inflammation in mice. *Res Rep Health Eff Inst*, 2001; 105(12): 5-58.
- 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.
- Wang XY, Li XL, Hong SQ, *et al.* Electroacupuncture induced spinal plasticity is linked to multiple gene expressions in dorsal root deafferented rats. *J Mol Neurosci*, 2009; 37(2): 97-110.
- Chen J, Qi JQ, 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.
- Kemi C, Grunewald J, Eklund A, *et al.* Differential regulation of neurotrophin expression in human bronchial smooth muscle cells. *Respir Res*, 2006; 7: 18.
- Braun A, Lommatzsch M, Mannsfeldt A, *et al.* Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999; 21(4): 537-546.
- García-Suárez O, Pérez-Pinera P, Laurà R, *et al.* TrkB is necessary for the normal development of the lung. *Respir Physiol Neurobiol*, 2009; 167(3): 281-291.
- Sopi RB, Martin RJ, Haxhiu MA, *et al.* Role of brain-derived neurotrophic factor in hyperoxia-induced enhancement of contractility and impairment of relaxation in lung parenchyma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008; 295(2): L348-L355.
- Noga O, Hanf G, Schäper C, *et al.* The influence of inhalative corticosteroids on circulating Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 in allergic asthmatics. *Clin Exp Allergy*, 2001; 31(12): 1906-1912.

(2014 - 10 - 09 收稿, 2015 - 02 - 17 修回)

编辑 余 琳