

论著 · 实验研究

# 产前补充牛磺酸对宫内生长受限胎鼠脑组织 PKA-CREB 通路及 GDNF mRNA 表达的影响

陈慧<sup>1</sup>, 李坚<sup>1</sup>, 刘敬<sup>2</sup>, 刘丽<sup>3</sup>, 刘娜<sup>3</sup>, 宋一志<sup>3</sup>

(1. 首都医科大学附属北京妇产医院, 北京 100026; 2. 北京军区总医院附属八一儿童医院, 北京 100700;  
3. 首都医科大学解剖与组织胚胎学系, 北京 100069)

**[摘要]** **目的** 探讨牛磺酸对宫内生长受限(IUGR)胎鼠大脑蛋白激酶 A-cAMP 反应元件结合蛋白(PKA-CREB)通路及胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)mRNA 表达的影响。**方法** 采用妊娠全程饥饿法制作 IUGR 模型,将 20 只孕鼠随机分为 4 组( $n=5$ ):对照组、IUGR 组、小剂量(每天 100 mg/kg)及大剂量(每天 300 mg/kg)牛磺酸用药组。利用逆转录-聚合酶链反应方法检测各组胎鼠大脑 PKA、CREB 及 GDNF mRNA 水平变化。**结果** 与对照组相比,IUGR 组胎鼠大脑 PKA、CREB 及 GDNF mRNA 表达均明显增多( $P<0.05$ )。与 IUGR 组相比,小剂量和大剂量牛磺酸组胎鼠脑组织的 PKA 和 CREB mRNA 表达水平增高( $P<0.05$ ),大剂量牛磺酸组胎鼠脑组织 GDNF mRNA 水平亦明显增高( $P<0.01$ )。**结论** 牛磺酸可增加 IUGR 胎鼠大脑 PKA-CREB 通路及 GDNF mRNA 的表达,提示产前补充牛磺酸可能通过增强中枢神经系统神经发生能力、增加神经营养因子的分泌等途径来改善 IUGR 胎鼠脑损伤,发挥对脑组织的保护作用。 [中国当代儿科杂志,2009,11(11):923-926]

**[关键词]** 宫内生长受限;牛磺酸;cAMP 反应元件结合蛋白;胶质细胞源性神经营养因子;胎鼠  
**[中图分类号]** R714.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)11-0923-04

## Effects of prenatal taurine on mRNA expression of PKA-CREB signal pathway and glial cell line-derived neurotrophic factor in fetal rat brains of intrauterine growth restriction

CHEN Hui, LI Jian, LIU Jing, LIU Li, LIU Na, SONG Yi-Zhi. Beijing Maternity Hospital, Capital Medical University, Beijing 100026, China (Liu J, Email:liujingbj@sina.com)

**Abstract: Objective** This study examined the effects of prenatal application of taurine on mRNA expression of protein kinase A-cAMP response element binding protein (PKA-CREB) signal pathway and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in fetal rat brains of intrauterine growth restriction (IUGR). **Methods** Pregnant rats were randomly divided into 4 groups: normal control, IUGR model, low-dose (100 mg/kg · d) and high-dose (300 mg/kg · d) taurine treatment IUGR ( $n=5$  each). IUGR was induced by food restriction throughout pregnancy. PKA, CREB and GDNF mRNA expression in brains of newborn rats was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** PKA, CREB and GDNF mRNA expression in the IUGR model group was significantly higher than that in the normal control group ( $P<0.05$ ). Compared with the IUGR model group, mRNA expression of PKA and CREB in both the low-dose and high-dose taurine treatment groups increased significantly ( $P<0.05$ ); GDNF mRNA expression in the high-dose taurine treatment group also increased significantly ( $P<0.01$ ). **Conclusions** Taurine can increase mRNA expression of PKA, CREB and GDNF in fetal rat brains of IUGR. This suggests that prenatal application of taurine may increase neurogenesis of the central nervous system and endogenous secretion of neurotrophic factors, thus providing neuroprotective effects. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (11):923-926]

**Key words:** Intrauterine growth restriction; Taurine; cAMP response element binding protein; Glial cell line-derived neurotrophic factor; Fetal rats

宫内生长受限(intrauterine growth restriction, IUGR)是由多种因素造成的胎儿在宫内生长发育受限。IUGR 儿不但围产期死亡率高,而且被认为是脑瘫的一个独立的高危因素,脑瘫的危险性与生长受限的程度呈正相关<sup>[1]</sup>。新近国外对 IUGR 患儿的随访研究显示,IUGR 对远期的神经系统发育、运动

[收稿日期]2009-05-25;[修回日期]2009-06-23  
[基金项目]首都医科大学基础-临床合作基金资助项目(2007JL53)。  
[作者简介]陈慧,女,硕士研究生。主攻方向:围产医学。  
[通讯作者]刘敬,男,主任医师,教授,北京军区总医院附属八一儿童医院,邮编:100700。

行为及智力发育也有深远影响,与学龄期学习成绩差、注意力集中短暂、智力低下、社会行为能力障碍等密切相关<sup>[2]</sup>。牛磺酸是中枢神经系统含量最丰富的游离氨基酸,是生长发育特定时期的条件必需氨基酸,具有抗氧化、防止钙超载、抗凋亡、抑制兴奋性氨基酸毒性等生物学活性。本研究通过建立 IUGR 动物模型,检测牛磺酸对 IUGR 胎鼠大脑蛋白激酶 A-cAMP 反应元件结合蛋白 (protein kinase A-cAMP response element binding protein, PKA-CREB) 及胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) mRNA 表达的影响,研究牛磺酸对 IUGR 胎鼠脑损伤的保护作用及机制,为牛磺酸临床防治 IUGR 脑损伤提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年 Sprague-Dawley 大鼠:雌性 20 只,雄性 10 只,体重 250 ~ 300 g。予标准大鼠颗粒饲料和充足饮水(动物与饲料均由首都医科大学实验动物中心提供)。每晚将雌雄大鼠以 2:1 合笼,次日晨取阴道分泌物镜检,以发现精子之日为妊娠第 0 天,按受孕顺序随机分为 4 组:对照组、IUGR 组、小剂量 (100 mg/kg · d) 及大剂量牛磺酸 (300 mg/kg · d) 治疗组,每组 5 只孕鼠。

1.2 IUGR 模型制作

对照组妊娠全程任意摄取饲料,并记录每日消耗饲料重量。采用母鼠全程饥饿法建立 IUGR 动物模型<sup>[3]</sup>,即母鼠受孕后第 1 日始至自然分娩每日予对照组进食量的 40% (10 g/d),饮水充足。小剂量和大剂量牛磺酸组自建立模型第 12 天始分别在饲料中添加牛磺酸每天 100 mg/kg 和每天 300 mg/kg<sup>[4]</sup> (Wako 公司提供,批号:205-00115),直至自然分娩。

IUGR 的判断标准:各组孕鼠自然分娩后,电子天平称量新生鼠体重,精确到 0.001 g,低于对照组新生鼠平均体重的 2 个标准差为 IUGR。

1.3 取材

每组随即抽取 10 只胎鼠,断头取脑称重 (精确到 0.001 g) 后,立即置于 -80℃ 下冻存待测。

1.4 PKA、CREB 及 GDNF mRNA 检测

采用半定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法。取胎鼠大脑皮质组织约 100 mg,TRIZOL 裂解液匀浆,提取纯化总 RNA,用 273BR02588 型核酸蛋白分析仪 (BIO-RAD) 进行定量,逆转录反应按照试

剂盒说明书 (Promega, A3500) 进行操作。引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计,经基因库检索验证且与其他基因无高度同源性,由上海生工生物技术工程公司合成,引物序列见表 1。Taq 酶购自大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa, DR001A),梯度基因扩增仪 (580BR, BIO-RAD) 进行扩增。PCR 扩增条件:95℃ 5 min;94℃ 30 s;退火 30 s (β-actin、PKA、CREB 及 GDNF 的退火温度分别为 51℃、55℃、61℃);72℃ 1 min,35 个循环;最后 72℃ 10 min。将 PCR 反应产物 7.5 μL 加 1.5 μL 载样缓冲液,在 1% 琼脂糖凝胶上电泳约 50 min (电压 100 V)。用凝胶成像系统进行成像及图象分析,以各组 PKA、CREB 及 GDNF mRNA 扩增产物的积分吸光度值与 β-actin 的比值作为 PKA、CREB 及 GDNF mRNA 的表达水平。

表 1 引物序列

| 基因      | 引物序列                               | 产物长度 (bp) |
|---------|------------------------------------|-----------|
| PKA     | F: 5'-GCTGG CTTTGATTTACGG-3'       | 505       |
|         | R: 5'-GATGT TTCGCTTGAGGATA-3'      |           |
| CREB    | F: 5'-TCAGCCGGGTACTACCATTTC-3'     | 252       |
|         | R: 5'-TCTCTTGCTGCTTCCCTG-3'        |           |
| GDNF    | F: 5'-CCCGAAGATTATCCTGACCA-3'      | 242       |
|         | R: 5'-TAGCCCAAACCAAGTCAGT-3'       |           |
| β-actin | F: 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3' | 349       |
|         | R: 5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'  |           |

1.5 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件对数据进行统计分析,所有计量资料用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用单因素方差分析,率的比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组新生鼠体重及脑重的比较

与对照组相比,IUGR 组新生鼠的平均体重和脑重均显著降低 ( $P < 0.01$ );小剂量、大剂量牛磺酸组新生鼠的平均体重和平均脑重均较 IUGR 组明显增加,且大剂量牛磺酸组胎鼠的平均体重和脑重均高于小剂量组 ( $P < 0.01$ );但与对照组相比,小剂量与大剂量牛磺酸组胎鼠体重、脑重均显著降低 ( $P < 0.01$ ) (表 2)。

2.2 各组新生鼠脑组织 PKA、CREB 及 GDNF mRNA 的表达

与对照组相比,IUGR 组胎鼠脑组织中 PKA、CREB 及 GDNF mRNA 表达均上调 ( $P < 0.05$  或

0.01);与 IUGR 组相比,小剂量与大剂量牛磺酸组的 PKA 和 CREB mRNA 表达水平均显著增高 ( $P<0.05$  或  $0.01$ )。小剂量牛磺酸组 GDNF mRNA 水平与 IUGR 组比较差异无显著性,而大剂量牛磺酸组 GDNF mRNA 水平则明显高于 IUGR 组 ( $P<0.01$ )。大剂量牛磺酸组胎鼠脑组织 PKA, CREB 及 GDNF mRNA 表达均高于小剂量组 ( $P<0.05$  或  $0.01$ )。见图 1。

表 2 各组新生鼠体重及脑重比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别               | 活胎数<br>(例) | 死产率<br>(%) | 体重(g)                      | 脑重(g)                      |
|------------------|------------|------------|----------------------------|----------------------------|
| 对照组              | 52         | 0          | 6.34±0.42                  | 0.24±0.02                  |
| IUGR 组           | 48         | 9.4        | 4.99±0.26 <sup>a</sup>     | 0.18±0.01 <sup>a</sup>     |
| 小剂量牛磺酸组          | 45         | 6.3        | 5.24±0.48 <sup>a,b</sup>   | 0.19±0.01 <sup>a,c</sup>   |
| 大剂量牛磺酸组          | 54         | 3.6        | 5.83±0.24 <sup>a,c,d</sup> | 0.21±0.02 <sup>a,c,d</sup> |
| F 值              |            | —          | 142.13                     | 156.39                     |
| χ <sup>2</sup> 值 |            | 5.185      | —                          | —                          |
| P 值              |            | 0.159      | 0.00                       | 0.00                       |

a:与对照组比较,  $P<0.01$ ; b:与 IUGR 组比较,  $P<0.05$ ; c:与 IUGR 组比较,  $P<0.01$ ; d:与小剂量牛磺酸组比较,  $P<0.01$

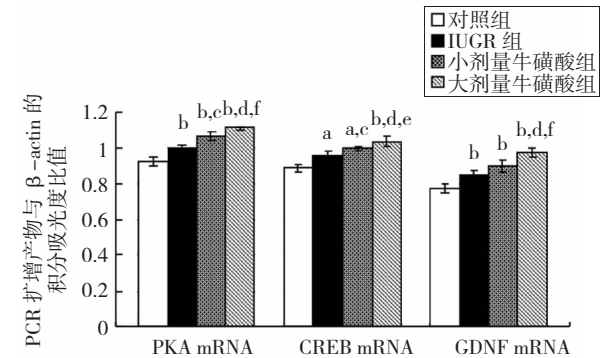


图 1 各组胎鼠脑组织 PKA、CREB 及 GDNF mRNA 表达水平 与对照组比较, a:  $P<0.05$ ; b:  $P<0.01$ ; 与 IUGR 组比较, c:  $P<0.05$ , d:  $P<0.01$ ; 与小剂量牛磺酸组比较, e:  $P<0.05$ , f:  $P<0.01$

3 讨论

妊娠期母体营养不良是 IUGR 的常见原因, 主要与母体营养不良引起的子宫胎盘功能不足, 经胎盘向胎儿运输的氧气和营养物质不足有关<sup>[5]</sup>, IUGR 儿不仅出生体重下降、脑容积减小<sup>[6]</sup>, 还出现脑发育障碍及学习记忆能力差、语言和自我管理能力障碍等神经行为学表现<sup>[2,7]</sup>。本试验采用孕鼠妊娠全程饥饿法建立模型, IUGR 胎鼠的体重和脑重均显著下降, 可能是母体营养不良造成宫内慢性缺血缺氧环境, 脑血流代偿不足以维持神经系统的正常发育的结果。研究显示, IUGR 可使脑组织 caspase-3

及 Bax 凋亡蛋白表达增多, 抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达减少, 脑细胞凋亡增多, 并增加大脑对缺氧的易损性<sup>[8]</sup>, 这也可能是 IUGR 胎鼠脑细胞减少、重量减轻的原因之一。

PKA-CREB 信号通路在神经发生、再生、突触可塑性和学习记忆中起重要作用。胞外信号与 G 蛋白耦联受体结合并活化 cAMP 环化酶时, 第二信使 cAMP 浓度增加, 可活化 PKA 并释放出催化亚基进入细胞核, 使转录因子 CREB 在 N 端转录活性区附近的 Ser133 磷酸化。磷酸化的 CREB 可与 DNA 分子上 CRE (cAMP response element, 环磷酸腺苷反应元件) 特定序列结合<sup>[9]</sup>, 进而调节下游靶基因如即早基因 (c-fos 等)、钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II (CaMK II)、脑源性神经营养因子 (BDNF) 及 GDNF<sup>[10]</sup> 等的转录。作为  $\beta$ -转化生长因子 ( $\beta$ -TGF) 超家族的一员, GDNF 通过由 GDNF 家族受体 (GDNF-family receptors, GFR $\alpha$ 1-4) 和酪氨酸激酶 Ret 构成的复合受体来介导其神经营养作用, 如抑制细胞凋亡, 促进神经元存活、分化及受损外周神经的再生<sup>[11]</sup>; 诱导脑室管膜下区 (subventricular zone, SVZ) 和海马区齿状回颗粒下层 (subgranular zone, SGZ) 的神经发生<sup>[12]</sup>; 维持多巴胺能黑质纹状体系统的发育, 改善神经行为学表现等<sup>[13]</sup>。不同胞外信号可通过增加  $Ca^{2+}$  浓度、促进 CREB 磷酸化、激活 MAPK-ERK (mitogen-activated protein kinases-extracellular signal-regulated kinases, 丝裂原激活蛋白激酶-胞外信号调节激酶) 或 cAMP/PKA 等信号通路来上调 GDNF 表达<sup>[14]</sup>。

本试验中 IUGR 胎鼠脑组织 PKA-CREB 通路和 GDNF mRNA 表达上调, 提示 IUGR 不良宫内环境可能通过作用 PKA-CREB 通路在一定程度上刺激中枢神经系统神经发生。IUGR 可引起中枢神经系统氧化还原系统稳态失衡<sup>[15]</sup>, 一氧化氮合成酶活化、自由基增多、 $Ca^{2+}$  稳态失调等损伤因素均可激活 PKA-CREB 通路, 从而在一定程度上增加 GDNF 表达, 或直接刺激大脑星形胶质细胞分泌 GDNF 增多, 属于中枢神经系统的一种内源性保护机制, 但这种有限的神经保护作用远远不足以弥补 IUGR 引起的脑细胞凋亡, IUGR 造成的神经发生-脑细胞凋亡系统之间严重失衡可能是 IUGR 脑发育障碍的重要原因。

产前予孕鼠补充牛磺酸可有效增加 IUGR 胎鼠体重和脑重, 并进一步上调 IUGR 胎鼠大脑 PKA-CREB 信号通路和 GDNF 的表达, 且大剂量效果明显优于小剂量。胎儿在发育过程中主要通过胎盘中

Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>依赖性的牛磺酸转运体以主动转运方式从母体获得牛磺酸。牛磺酸具有调节渗透压、维持钙稳态、抗氧化、抑制兴奋性氨基酸毒性<sup>[16]</sup>、增强学习记忆能力、促进神经发生及抗凋亡等多种生物学作用。牛磺酸在体外还可通过激活海马CA1区PKA-CREB通路来调控长时程增强晚期,参与突触可塑性及学习记忆过程<sup>[17]</sup>。结合前期研究提示,牛磺酸可能一方面通过抑制Bax、caspase-3和caspase-9<sup>[8,18]</sup>等凋亡基因表达并上调Bcl-2表达来减少脑细胞凋亡,另一方面通过上调PKA-CREB通路、增加GDNF表达来增强中枢神经系统神经发生能力,从而维持脑细胞增殖分化-脑细胞凋亡系统之间的平衡,改善IUGR脑损伤。

有关牛磺酸对脑细胞增殖分化趋势的影响及作用机制方面的研究仍将继续深入,从而为临床上在产前补充牛磺酸防治IUGR儿脑损伤提供更全面的实验基础和一定的理论依据,对改善IUGR儿生存质量有重要意义。

[参 考 文 献]

[1] Jacobsson B, Ahlin K, Francis A, Hagberg G, Hagberg H, Gardosi J. Cerebral palsy and restricted growth status at birth: population-based case-control study[J]. BJOG, 2008, 115(10):1250-1255.

[2] 陈慧,刘敬. 宫内生长受限对围产期脑发育的影响[J]. 中华儿科杂志, 2009, 47(1):33-35.

[3] 黄婷婷,丘小汕,杜敏联,沈振宇,柯志勇,赖峰. 宫内生长迟缓大鼠脂肪组织肿瘤坏死因子αmRNA表达与胰岛素抵抗关系的研究[J]. 中华儿科杂志,2005,43(1):39-42.

[4] 李新娟,葛治国,李东亮,李庆岗,李明阳,秦宇,等. 牛磺酸对大鼠脑损伤后认知功能及海马凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 新乡医学院学报, 2006, 23(6):569-571.

[5] Cetin I, Alvino G. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport. A review [J]. Placenta, 2009, 30(Suppl A):S77-S82.

[6] Samuelsen GB, Pakkenberg B, Bogdanovic N, Gundersen HJ, Larsen JF, Graem N, et al. Severe cell reduction in the future brain cortex in human growth-restricted fetuses and infants[J].

Am J Obstet Gynecol, 2007, 197(1):56.e1-7.

[7] Lodygensky GA, Seghier ML, Warfield SK, Tolsa CB, Sizonenko S, Lazeyras F, et al. Intrauterine growth restriction affects the pre-term Infant's hippocampus[J]. Pediatr Res, 2008, 63(4):438-443.

[8] 刘丽,陈慧,刘娜,刘敬,景鹏,杨连雪. 牛磺酸对宫内生长受限新生幼鼠大脑Bcl-2, Bax及Caspase-3蛋白表达的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(2):109-111.

[9] Hannila SS, Filbin MT. The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2008, 209(2):321-332.

[10] Kerschensteiner M, Meinel E, Hohlfeld R. Neuro-immune crosstalk in CNS diseases[J]. Results Probl Cell Differ, 2009, 158(3):1122-1132.

[11] Wood MD, Moore AM, Hunter DA, Tuffaha S, Borschel GH, Mackinnon SE, et al. Affinity-based release of glial-derived neurotrophic factor from fibrin matrices enhances sciatic nerve regeneration[J]. Acta Biomaterialia, 2009, 5(4):959-968.

[12] Kaneko N, Sawamoto K. Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions[J]. Neurosci Res, 2009, 63(3):155-164.

[13] Sandhu JK, Gardaneh M, Iwasio R, Lanthier P, Gangaraju S, Ribecco-Lutkiewicz M, et al. Astrocyte-secreted GDNF and glutathione antioxidant system protect neurons against 6OHDA cytotoxicity[J]. Neurobiol Dis, 2009, 33(3):405-414.

[14] Saavedra A, Baltazar G, Duarte EP. Driving GDNF expression: The green and the red trafficlighs[J]. Prog Neurobiol, 2008, 86(3):186-215.

[15] Tatli M, Guzel A, Kizil G, Kavak V, Yavuz M, Kizil M. Comparison of the effects of maternal protein malnutrition and intrauterine growth restriction on redox state of central nervous system in offspring rats[J]. Brain Res, 2007, 1156:21-30.

[16] Wu J, Kohno T, Georgiev SK, Ikoma M, Ishii H, Petrenko AB, et al. Taurine activates glycine and gamma-aminobutyric acid A receptors in rat substantia gelatinosa neurons[J]. Neuroreport, 2008, 19(3):333-337.

[17] del Olmo N, Handler A, Alvarez L, Bustamante J, Martin del Rio R, Solis JM. Taurine-induced synaptic potentiation and the late phase of long-term potentiation are related mechanistically[J]. Neuropharmacology, 2003, 44(1):26-39.

[18] Taranukhin AG, Taranukhina EY, Saransaari P, Djatchkova IM, Pelto-Huikko M, Oja SS. Taurine reduces caspase-8 and caspase-9 expression induced by ischemia in the mouse hypothalamic nuclei[J]. Amino Acids, 2008, 34(1):169-174.

(本文编辑:王庆红)