

早期环境对大鼠脑源性神经营养因子及其受体表达和脑发育的影响

陈金兰 陈燕惠

(福建医科大学附属协和医院儿科,福建 福州 350001)

[摘 要] 目的 通过研究早期环境对大鼠学习记忆能力及脑源性神经营养因子(BDNF)及其受体—酪氨酸激酶受体 B(TrkB)表达的影响,探讨早期环境对发育期大鼠脑发育的影响及可能调控机制。方法 45 只新生 Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为丰富环境组、隔离环境组及对照组,每组 15 只。丰富环境组处于丰富环境中饲养,隔离环境组大鼠在单调环境下成长,对照组大鼠在普通环境中常规饲养。大鼠生后 28~29 d 采用“Y”臂迷宫试验检测学习记忆功能。海马 CA3 区与额叶皮质区神经元数量及 BDNF、TrkB 表达水平分别采用尼氏染色、免疫组织化学染色方法进行检测。结果 与隔离环境组及对照组相比,丰富环境组大鼠达到学会标准所需训练的次数减少($P<0.01$),记忆保持百分率提高($P<0.01$);与对照组相比,隔离环境组大鼠达到学会标准所需训练的次数增加($P<0.01$),记忆保持百分率下降($P<0.01$)。尼氏染色结果显示,3 组间额叶皮质区及海马 CA3 区神经元数量以丰富环境组最高,对照组次之,隔离环境组最低($P<0.01$);免疫组织化学染色结果显示,丰富环境组大鼠海马 CA3 区及额叶皮质区 BDNF 及 TrkB 表达水平高于对照组和隔离环境组($P<0.01$),且隔离环境组 BDNF 及 TrkB 表达水平低于对照组($P<0.01$)。结论 早期环境可通过影响海马与额叶 BDNF 及其受体 TrkB 表达,而影响发育期大鼠远期脑发育及脑功能。 [中国当代儿科杂志,2012,14(9):703-707]

[关键词] 早期环境;脑源性神经营养因子;酪氨酸激酶受体 B;脑发育;大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2012)09-0703-05

Effects of early environment on the expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor and brain development

CHEN Jin-Lan, CHEN Yan-Hui. Department of Pediatrics, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China(Chen Y-H, Email: yanhui_0655@126.com)

Abstract: Objective To study the effect of early environment on the learning-memory ability of rats and the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor, tyrosine kinase receptor B (TrkB), and to explore the influence of early environment on development of rat brain in developing stage and possible regulation mechanisms. **Methods** Forty-five newborn Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups (15 rats in each group): enriched environment group (EE group), isolated environment group (IE group) and normal control group (NC group). The pups were nurtured separately in their groups. The learning-memory abilities of the rats were measured by "Y"-arm maze test 28 to 29 days after birth. The number of neural cells and the expression of BDNF and TrkB in the hippocampal CA3 and frontal lobewere were detected by Nissl's staining and immunohistochemistry respectively. **Results** The results of the "Y"-arm maze test showed that rats in the EE group needed less training times, and retained a higher percentage of memory than the other two groups ($P<0.01$). Rats in the IE group needed more training times, and retained a lower percentage of memory than the NC group ($P<0.01$). By Nissl's staining, the numbers of neural cells in the hippocampal CA3 and frontal lobe were highest in the EE group followed by the NC group. They were lowest in the IE group ($P<0.01$). By immunohistochemistry, the expression of BDNF in the hippocampal CA3 and frontal lobe were highest in the EE group followed by the NC group. It was lowest in the IE group ($P<0.01$). Results were similar for expression of TrkB. **Conclusions** Early environment can affect the long-term brain development and brain function of rats by influencing the expression of BDNF and its receptor TrkB in the hippocampus and frontal lobe. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(9):703-707]

Key words: Early environment; Brain-derived neurotrophic factor; Tyrosine kinase receptor B; Brain development; Rats

[收稿日期]2012-03-27;[修回日期]2012-04-17
[基金项目]福建医科大学重大科研项目基金资助项目(No. 2009D064)。
[作者简介]陈金兰,女,硕士研究生。
[通信作者]陈燕惠,教授。

生命早期是神经元生长、分化和突触形成的关键时期。1947年Hebb首次提出丰富环境刺激可促进脑功能的发展^[1]。近年来,许多研究表明,早期环境对脑发育和远期行为有深刻的影响,其中早期丰富环境对发育期动物和儿童远期认知、性格特征产生积极影响^[2-4];而早期隔离环境作为研究生命早期应激的常用模型,可引起发育期大鼠认知缺陷、学习记忆能力减退、焦虑样行为等^[5-6]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是哺乳类动物脑内分布最广、含量最高的神经生长因子,本研究拟通过研究早期环境对发育期大鼠BDNF及其特异受体-酪氨酸激酶受体B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)的影响,探讨早期环境对脑发育的影响及可能调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

清洁级Sprague-Dawley (SD)孕鼠6只,体重300~350 g,购于上海斯莱克实验动物有限公司。将45只新生SD仔鼠,体重相近,雌雄不限,随机分为丰富环境组、隔离环境组和正常对照组,每组15只。动物饲养环境温度控制在 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度56%,12 h光照刺激,12 h间断照明,大鼠自由摄食、饮水,定期换笼饲养。

1.2 环境干预

1.2.1 丰富环境 丰富环境^[7-8]为一大笼($42\text{ cm} \times 26\text{ cm} \times 21\text{ cm}$)内放置不同颜色及形状的物体,包括管道、秋千、斜坡和玩具等,每周定期更换笼中物体2次。仔鼠断乳前,即出生后1 d (P1)~P20,每日上午9:00~12:00从母鼠笼中将仔鼠移到丰富环境中3 h;自断乳起(P21)仔鼠全天放入丰富环境中,持续至第28天。当仔鼠置于丰富环境时,每日一次以明暗红色灯光刺激视觉发育,同时播放轻音乐刺激听觉发育,全程15 min。

1.2.2 隔离环境 参照文献设计^[9]。隔离环境为笼内不放置任何物体的单调笼。P1~P20,每日上午9:00~12:00将仔鼠从母鼠笼中移至隔离环境3 h,自P21起仔鼠全天放入隔离环境中,持续至第28天。

1.2.3 正常对照 大鼠置于原环境下饲养,即P1~P20,每日上午9:00~12:00将母鼠移出普通饲养笼3 h。自P21起将母鼠全天移出,实验仔鼠与其它同窝生大鼠原笼饲养,持续至第28天。

1.3 方法

1.3.1 行为学测试 “Y”臂迷宫试验装置参照文献^[10]自制。通过灯光和电刺激,使动物形成回避

条件反射,观察和记录动物的回避条件反应能力和空间辨别能力,从而分析和推断动物的学习、记忆和空间认知等方面的能力。学习分辨能力的检测:于生后第28天傍晚时进行检测,训练大鼠由暗臂(通电)跑向亮臂(断电)以逃避电击(即为正确)。每次测试随机点亮一臂,检测大鼠学会逃避电击的能力,连续10次试验中9次正确即为学会,以达到学会标准需要训练的次数为学习能力的指标。记忆保持能力的检测:测试学习分辨能力后24 h,再次检测,观察10次中有几次正确,以百分数表示。

1.3.2 实验取材 每组15只大鼠分别于生后第32天时,予10%水合氯醛麻醉后(300 mg/kg),剪开腹腔及膈肌,暴露心脏,20 mL生理盐水经升主动脉快速冲洗,再灌注40 g/L多聚甲醛磷酸缓冲液(4°C)100 mL,维持30 min。开颅取脑,参照Paxinos-Watson图谱^[11]在冰上快速分离海马、额叶,放于40 g/L多聚甲醛中固定过夜。常规脱水、石蜡包埋、连续冠状切片,切片厚度4 μm ,间隔6张切片取1张切片,进行尼氏染色或免疫组织化学染色,每个样本分别取6张切片行单项染色实验,各切片取3个视野进行观察。

1.3.3 尼氏染色 切片常规脱蜡至水;1%甲苯胺蓝溶液(福州迈新公司)于 $50 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 温箱中染色10 min,自来水冲洗;自来水浸泡15 min或温水浸泡(约 50°C)5 min;常规脱水、透明、封片;光镜下计数外形及内部结构完整的神经元数目并取均值。

1.3.4 免疫组织化学染色 实验用BDNF(sc-20981)兔抗大鼠多克隆抗体与TrkB(sc-8316)兔抗大鼠多克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司,SP法免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒及羊抗兔二抗均购自北京中杉金桥公司。切片常规脱蜡至水,于0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液中进行高压抗原修复,3%过氧化氢室温孵育10 min,正常山羊血清 37°C 封闭20 min,滴加兔抗大鼠BDNF多克隆抗体(1:200)或兔抗大鼠TrkB抗体(1:150), 4°C 湿盒内孵育过夜,滴加二抗辅助试剂室温孵育10 min,滴加羊抗兔二抗 37°C 孵育30 min,DAB显色2 min,苏木素复染1 min,透明、中性树脂封片。阴性对照用PBS替代一抗。采用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统,分析各脑区每高倍镜视野下BDNF和TrkB的免疫组织化学染色的积分光密度(integrated optical density, IOD),并取平均值。

1.4 统计学分析

应用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示($\bar{x} \pm s$),多组间比较采

用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD-*t* 检验,相关性分析采用 Pearson 相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重发育比较

在不同日龄检测各组大鼠体重发育情况,结果显示各组间大鼠在不同日龄体重发育情况方面差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠不同日龄体重比较 ($\bar{x}\pm s$,g)					
组别	鼠数	P1	P5	P21	P30
对照组	15	6.3±0.5	11.4±1.2	46.6±5.6	88.1±7.9
丰富环境组	15	6.5±0.5	11.7±0.9	46.7±4.4	89.3±6.3
隔离环境组	15	6.6±0.8	11.6±0.7	45.6±5.6	88.9±10.1
<i>F</i> 值		1.160	0.630	0.218	0.080
<i>P</i> 值		0.324	0.593	0.805	0.922

2.2 各组大鼠行为学试验结果比较

在“Y”臂迷宫试验中,与隔离环境组及对照组相比,丰富环境组大鼠达到学会标准所需训练的次数减少($P<0.01$),记忆保持百分率提高($P<0.01$)。与对照组相比,隔离环境组大鼠达到学会标准所需训练的次数增加($P<0.01$),记忆保持百分率下降($P<0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠学习记忆成绩比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	达学会标准次数	记忆保持能力(%)
对照组	15	16.1±2.0	61.3±11.3
隔离环境组	15	22.1±2.6 ^a	41.3±10.6 ^a
丰富环境组	15	12.6±1.6 ^{a,b}	82.7±9.6 ^{a,b}
<i>F</i> 值		76.30	58.01
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与隔离环境组比较, $P<0.01$

2.3 各组大鼠海马 CA3 区及额叶皮质区形态学改变

尼氏染色结果显示,每高倍镜视野(HP)下,对照组大鼠海马 CA3 区及额叶皮质区神经元染色浅,异染色质少,核较为清晰;隔离环境组大鼠海马 CA3 区及额叶皮质区神经元细胞均有变性、坏死,神经元及胶质细胞严重皱缩深染,细胞核变小,甚至细胞脱落,存活神经元数目少于对照组($P<0.05$);丰富环境组海马 CA3 区及额叶皮质区神经元细胞核、核仁清晰,轴突和树突易区分,存活神经元数目多于对照组($P<0.01$)。见表 3,图 1。

表 3 各组大鼠海马 CA3 区及额叶皮质区神经元数目比较(个/HP)

组别	鼠数	海马 CA3 区	额叶皮质区
对照组	15	60±9	66±9
隔离环境组	15	49±9 ^b	51±11 ^a
丰富环境组	15	74±6 ^{a,c}	80±12 ^{a,c}
<i>F</i> 值		12.69	27.40
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与对照组比较, $P<0.05$;c:与隔离环境组比较, $P<0.01$

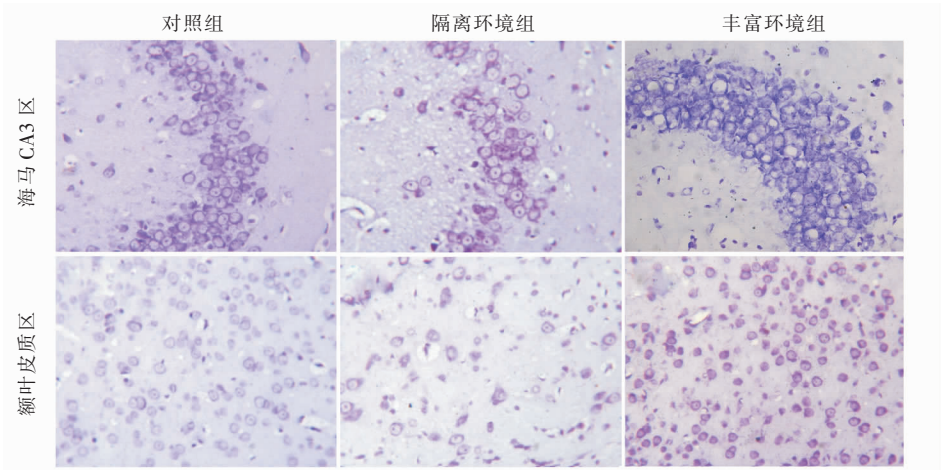


图 1 各组大鼠神经元尼氏染色结果(×400) 尼氏染色显示丰富环境组海马 CA3 区和额叶皮质区神经元数目显著多于隔离环境组及对照组,隔离环境组神经元数目较对照明显减少。

2.4 各组大鼠海马 CA3 区及额叶皮质区 BDNF 及 TrkB 表达水平比较

BDNF 及其受体 TrkB 的阳性表达产物为胞浆内褐色沉淀物,广泛分布于海马 CA3 区及额叶皮质结构,高倍镜下观察阳性颗粒分布于神经元胞体并延续到纤维(图 2~3)。与对照组及隔离环境组比较,丰富环境组海马 CA3 区及额叶皮质区的 BDNF 及其受体 TrkB 表达均增多($P<0.01$);与对照组相比,隔离环境组海马 CA3 区及额叶皮质区的 BDNF 及其受体 TrkB 表达均减少($P<0.01$)。见表 4。

表 4 各组大鼠海马 CA3 区及额叶皮质区 BDNF 及其受体 TrkB 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BDNF IOD		TrkB IOD	
		海马 CA3 区	额叶皮质区	海马 CA3 区	额叶皮质区
对照组	15	91 ± 12	98 ± 20	86 ± 14	80 ± 20
隔离环境组	15	68 ± 19 ^a	67 ± 22 ^a	64 ± 12 ^a	65 ± 26 ^a
丰富环境组	15	105 ± 17 ^{a,b}	121 ± 18 ^{a,b}	105 ± 15 ^{a,b}	113 ± 29 ^{a,b}
F 值		19.68	26.76	34.64	13.86
P 值		0.001	0.001	0.001	0.001

a:与对照组比较, $P<0.01$;b:与隔离环境组比较, $P<0.01$

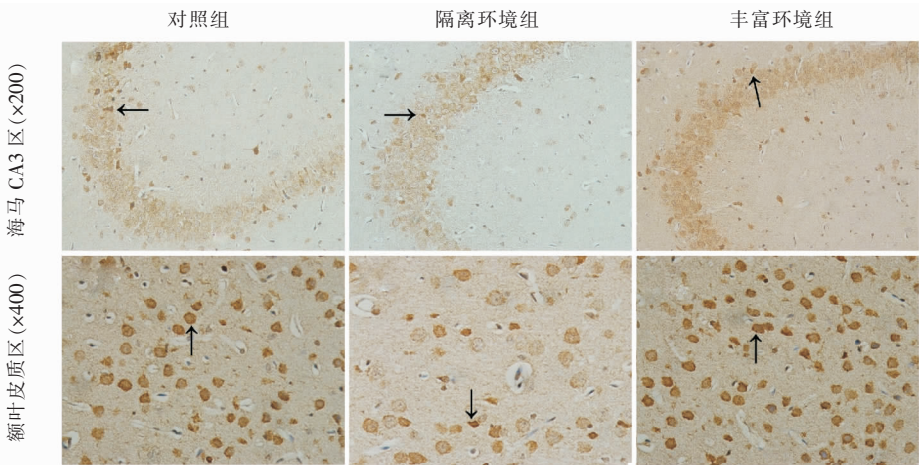


图 2 各组大鼠 BDNF 免疫组化染色结果 丰富环境组海马 CA3 区及额叶皮质区的 BDNF 表达均较隔离环境组和对照组增多,隔离环境组海马 CA3 区及额叶皮质区 BDNF 表达较对照组明显减少。箭头所示褐色沉淀物为阳性颗粒。

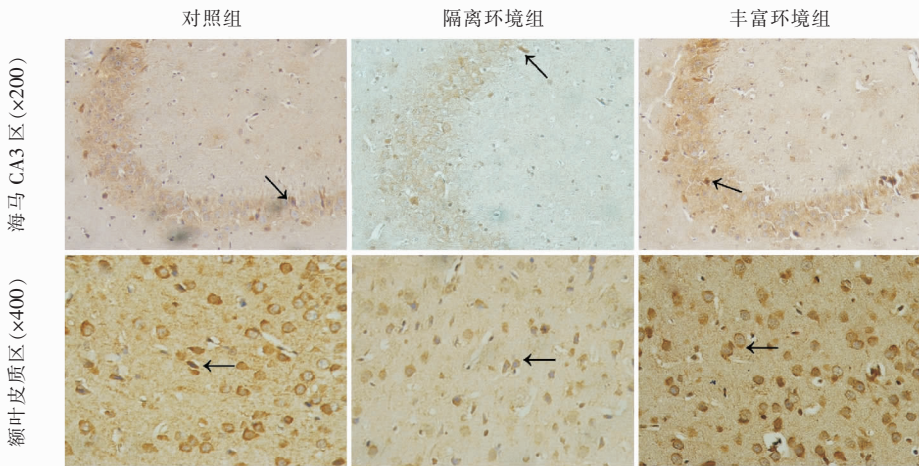


图 3 各组大鼠 TrkB 免疫组化染色结果 丰富环境组海马 CA3 区及额叶皮质区的 TrkB 表达均较隔离环境组和对照组增多,隔离环境组海马 CA3 区及额叶皮质区 TrkB 表达较对照组明显减少。箭头所示褐色沉淀物为阳性颗粒。

3 讨论

BDNF 是哺乳类动物脑内分布最广、含量最高的神经生长因子,1982 年由德国神经生物学家 Brade

Y. A 从猪脑中分离纯化,系由神经元、神经支配的靶组织或神经胶质细胞等分泌的多肽,在中枢神经系统神经元中广泛表达,其阳性颗粒分布于神经元胞体并延续到纤维,以海马回 CA1~CA4 区、齿状回和皮质的含量最高,是神经系统发育过程中的关键

信号分子,与特异性高亲和力受体 TrkB 结合,激活细胞内信号转导,发挥生物学效应^[12-13]。BDNF 及其受体在大脑高级活动如学习、记忆和认知行为中,起着极为重要的作用,在神经系统的不同发育时期和不同部位有着不同的表达,受发育的调控^[14-15]。

额叶和海马被认为是学习和记忆的关键部位,在调节学习、记忆等认知能力方面发挥着重要的作用,并且是 BDNF 和 TrkB 表达最为丰富的脑区^[1,16-17]。

本研究显示在保证食物、水分供给的条件下,早期不同环境饲养成长的大鼠,尽管体重变化无明显差异,但脑发育与脑功能却有明显差异。神经元是神经系统的结构和功能单位,尼氏小体是神经元的特征性结构之一。在生理情况下,尼氏体大而数量多,反映神经细胞合成蛋白质的功能较强。本研究发现,隔离环境下成长的大鼠海马 CA3 区及额叶皮质区的 BDNF 及其受体 TrkB 表达较对照组明显减少,部分海马 CA3 区及额叶皮质区神经元细胞变性、坏死,神经元及胶质细胞严重皱缩深染,细胞核变小,甚至细胞脱失,存活神经元数目较对照组大鼠明显减少;同时,成年后学习记忆能力也明显落后于对照组大鼠,表现为在“Y”臂迷宫试验中达到学会标准所需训练的次数增多,记忆保持百分率降低。而丰富环境下成长的大鼠海马 CA3 区及额叶皮质区的 BDNF 及其受体 TrkB 表达明显增多,存活神经元数目也多于对照组。同时,行为学试验结果显示,丰富环境组大鼠在“Y”臂迷宫测试中达到学会标准所需训练的次数少、记忆保持百分率高。提示早期环境可能通过影响与学习记忆相关脑区 BDNF 及其受体 TrkB 的表达,而影响脑发育与认知功能。

[参 考 文 献]

[1] Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR. Recovery from brain injury in animals; relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002) [J]. Prog Neurobiol, 2004, 72(3): 167-182.

[2] 陆澄秋,钟乐,田英,颜崇淮,沈晓明. 断乳前丰富环境对即刻早期基因 Are 的表达及长时记忆的影响[J]. 中国当代儿科杂

志, 2008, 10(2): 179-182.

[3] Woodcock EA, Richardson R. Effects of multisensory environmental stimulation on contextual conditioning in the developing rat [J]. Neurobiol Learn Mem, 2000, 74(2): 89-104.

[4] Hui JJ, Zhang ZJ, Liu SS, Xi GJ, Zhang XR, Teng GJ, et al. Hippocampal neurochemistry is involved in the behavioural effects of neonatal maternal separation and their reversal by post-weaning environmental enrichment: a magnetic resonance study [J]. Behav Brain Res, 2011, 217(1): 122-127.

[5] Callaghan BL, Richardson R. Maternal separation results in early emergence of adult-like fear and extinction learning in infant rats [J]. Behav Neurosci, 2011, 125(1): 20-28.

[6] Morrison AP. A cognitive behavioural perspective on the relationship between childhood trauma and psychosis [J]. Epidemiol Psychiatr Soc, 2009, 18(4): 294-298.

[7] 刘玲,陈燕惠,陈达光. 早期干预对宫内缺氧缺血大鼠脑电波及存活神经元数目的影响 [J]. 中华妇幼临床医学杂志, 2007, 3(2): 91-93.

[8] 马良,陈燕惠,韦立新. 早期丰富环境对大鼠远期行为发育及血清皮质酮的影响 [J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(7): 586-589.

[9] Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW, et al. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation [J]. Neurosci Res, 2007, 58(1): 32-39.

[10] 章子贵,杜红燕,陆汉新,张维宁,吴馥梅. 自然衰老过程中小鼠学习记忆行为变化的动态观察 [J]. 中国老年学杂志, 1995, 15(6): 354-356.

[11] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 71-104.

[12] Cohen S, Greenberg ME. Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2008, 24: 183-209.

[13] Nagappan G, Lu B. Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications [J]. Trends Neurosci, 2005, 28(9): 464-471.

[14] Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory [J]. Life Sci, 2002, 70(7): 735-744.

[15] Martinowich K, Manji H, Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety [J]. Nat Neurosci, 2007, 10(9): 1089-1093.

[16] Broersen LM. Attentional processes and learning and memory in rats: the prefrontal cortex and hippocampus compared [J]. Prog Brain Res, 2000, 126: 79-94.

[17] Howland JG, Wang YT. Synaptic plasticity in learning and memory: stress effects in the hippocampus [J]. Prog Brain Res, 2008, 169: 145-158.

(本文编辑:万静)