

吴晓东,杨锦,贾小娥,等. BDNF及其受体 TrkB 在低氧预适应小鼠中的表达变化和作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 47-53.

Wu XD, Yang J, Jia XE, et al. The expression and function of BDNF and its receptor TrkB in hypoxic preconditioned mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 47-53.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.01.008

# BDNF 及其受体 TrkB 在低氧预适应小鼠中的表达变化和作用

吴晓东<sup>1,2</sup>, 杨 锦<sup>1,2</sup>, 贾小娥<sup>1,2,3</sup>, 巴德仁贵<sup>1,2,3</sup>, 谢 伟<sup>1,2,3\*</sup>, 邵 国<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 包头医学院生物医学研究中心与神经科学研究所, 内蒙古 包头 014040; 2. 内蒙古自治区低氧转化医学重点实验室, 内蒙古 包头 014040; 3. 首都医科大学宣武医院低氧适应转化医学北京市重点实验室, 北京 100053)

**【摘要】** 目的 探究 BDNF、TrkB 受体及 BDNF/TrkB 信号通路在急性低氧与低氧预适应小鼠中的表达变化及作用, 进一步完善低氧预适应神经保护的分子机制, 为低氧预适应的临床应用提供理论依据。方法 以 ICR 小鼠为对象, 分别构建急性低氧与低氧预适应小鼠模型, 模型构建完成 0~4 d 后, 通过 Western blot、real-time PCR 技术, 检测小鼠海马脑区 BDNF、TrkB 受体在早期相和晚期相的表达及 BDNF/TrkB 信号通路活性的变化。结果 研究发现随着小鼠低氧次数的增加, 耐受时间明显增加 ( $P < 0.05$ ); 较对照组, 急性低氧和低氧预适应组 BDNF 及全长型 TrkB 受体表达有增加的趋势, 在低氧预适应早期相 BDNF 蛋白水平表达显著增加 ( $P < 0.05$ )。较对照组, 截短型 TrkB 受体表达则有降低的趋势, 在低氧预适应中、晚期相其 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); 较对照组, 急性低氧组 BDNF/TrkB 信号通路活性被抑制, 而低氧预适应组 BDNF/TrkB 信号通路活性有增加的趋势, 且在晚期相差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。结论 低氧预适应可能是通过上调 BDNF 表达并增加其与 TrkB 受体的结合, 以及下调截短型 TrkB 受体表达, 减少异二聚体形成, 从而共同激活 BDNF/TrkB 信号通路, 最终对小鼠产生神经保护作用。

**【关键词】** 低氧; 低氧预适应; 脑源性神经营养因子; 酪氨酸激酶受体 B; 小鼠

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 01-0047-07

## The expression and function of BDNF and its receptor TrkB in hypoxic preconditioned mice

WU Xiaodong<sup>1,2</sup>, YANG Jin<sup>1,2</sup>, JIA Xiao'e<sup>1,2,3</sup>, BADE Rengui<sup>1,2,3</sup>, XIE Wei<sup>1,2,3\*</sup>, SHAO Guo<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Biomedicine Research Center and Neuroscience institute, Baotou Medical College, Baotou 014040, China.

2. Inner Mongolia Key laboratory of Hypoxia Translational Medicine, Baotou 014040. 3. Beijing Key Laboratory of Hypoxia Conditioning Translational Medicine, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053)

**【Abstract】 Objective** To explore the expression and mechanism of BDNF and TrkB receptors under acute hypoxia and hypoxic preconditioning, and to provide a reference for the study and clinical application of hypoxic preconditioning. **Methods** A model of acute hypoxia and hypoxic preconditioning was generated in ICR mice. After 0-4 days, the hippocampus was isolated from the brains of hypoxic mice, and the protein and gene expressions of BDNF and its

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(编号:31860307); 内蒙古自治区高等学校“青年科技英才支持计划”项目(编号: NJYT-18-B26); 包头医学院科学研究基金项目(编号: BYJJ-YF 201606); 包头医学院花蕾计划项目(编号: 2017BYJJ-HL-01, 2017BYJJ-HL-09)。

**【作者简介】** 吴晓东(1992—), 男, 硕士研究生, 专业: 神经生物学。E-mail: 779709984@qq.com

**【通信作者】** 谢伟(1985—), 男, 副教授, 研究方向: 低氧神经保护。E-mail: xiewei19850218@sina.com

邵国(1976—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 低氧神经保护。E-mail: shootshao@163.com \* 共同通信作者

receptor TrkB were detected by Western blot and real-time PCR. **Results** The study found that the tolerance time was increased significantly with the increased amount of hypoxia in mice ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the expression of BDNF and the full-length TrkB receptor in the hypoxia group was increased, and the expression of BDNF protein was significantly increased in the early phase of hypoxic preconditioning ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the expression of the truncated TrkB receptor was decreased, and the expression of mRNA was significantly decreased in the middle and late phase of hypoxic preconditioning ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the activity of the BDNF/TrkB signaling pathway was inhibited in the acute hypoxia group and increased in the hypoxic preconditioning group. The activity of the BDNF/TrkB signaling pathway was significantly increased in the late phase ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Hypoxic preconditioning may be mediated by upregulating the binding between BDNF and TrkB, downregulating the expression of truncated TrkB, reducing the formation of heterodimers, and co-activating the BDNF/TrkB signaling pathway, which ultimately has a neuroprotective effect in mice.

**【Keywords】** hypoxia; hypoxic preconditioning(HPC); brain derived neurotrophic factor(BDNF); tyrosine kinase receptor B(TrkB); mouse

低氧/缺血是目前临床治疗中常见的病症及致病因素<sup>[1]</sup>,也是潜水、高原、航天等极端环境中面临的重要课题。机体缺氧能够引起神经系统的损伤,研究表明急性缺氧常导致脑损伤,并诱导神经元的损伤因子产生<sup>[2-3]</sup>。而低氧预适应(hypoxic preconditioning,HPC)是机体受到多次短暂、非致死性的低氧刺激后产生的内源性保护机制<sup>[4]</sup>,能对机体组织尤其是脑组织产生保护作用。HPC可通过调节细胞的存活、迁移、细胞凋亡过程密切相关的因子表达,发挥其对神经系统的内源性保护作用<sup>[5]</sup>,然而相关的分子机制仍未明确。

脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)是脑内合成的一种碱性蛋白<sup>[6]</sup>,具有减少神经元损伤和死亡、调控受损神经元分化和再生以及监视神经元病理状态等功能。酪氨酸激酶受体 B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)是 BDNF 特异性的受体<sup>[7]</sup>,二者结合后,可激活 BDNF/TrkB 信号通路途径,对大脑正常发育、突触可塑性以及神经元板层结构的形成发挥重要的生物学作用。研究发现<sup>[8]</sup>,急性低氧损伤可造成 BDNF、TrkB 受体及其信号通路的改变,但 BDNF、TrkB 受体及 BDNF/TrkB 信号通路是否参与 HPC 的神经保护机制则仍未有定论。因此,本文通过研究急性低氧和 HPC 对 BDNF 及其受体 TrkB3 在早、晚期相表达的影响以及对 BDNF/TrkB 信号通路活性产生的作用,为后续低氧研究特别是为 HPC 神经保护的分子机制研究提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

6~8 周后的 SPF 级雄性 ICR 小鼠(18~22 g)

229 只,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2016-0002]。本研究经包头医学院实验动物伦理委员会批准(包院字 20180901),实验小鼠在自然通风饲养室中饲养[SYXK(京)2015-0023],实验在 PCR 室和蛋白操作室中进行,建模在实验准备室中进行,取材操作在实验准备室中进行。并按实验动物使用的 3R 原则给予了人道关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

组织细胞裂解液,北京博奥森生物技术有限公司;检测蛋白浓度试剂盒,美国 Thermo 公司产品;蛋白酶抑制剂,美国 Thermo 公司产品;磷酸酶抑制剂, MCE 公司产品;30%丙烯酰胺;Tris.Hcl 液体及 10%过硫酸铵;奶粉;胎牛血清;兔源单克隆抗体及 HRP 标记羊抗兔抗体,美国 SANTA 公司产品;超敏发光液(北京普利赖基因公司);TaKaRa 公司产品;氯仿;异丙醇;75%酒精;DEPC 水;cDNA 反转录试剂盒, Thermo 公司产品;DNA 合成引物,生物工程(上海)有限公司;Real-time PCR Mixture,北京康为生物技术有限公司。

超声波破碎仪(FB 50);酶标仪(Multiskan FC);制胶设备;蛋白电泳及转膜设备(Trans-Blot);全自动化学发光成像分析系统(Tanon 5800);掌上离心机(D1008);台式低速离心机(TDZ4-WS);小型台式高速冷冻离心机(Eppendorf 5424R);混匀仪(MX-S/RL-Pro);恒温振荡器(SHZ-82);微波炉(Galani);Real-time PCR 仪(ABI7900HT);精密交流净化稳压电源(PRECISE AC PURIFYING, REGUCATEO Power Supply);磁力加热搅拌机(MS-H280-Pro);涡旋振荡器(Thermo Fisher)天平(SQP 型-QUINTIX313)等。250 mL 的透明广口瓶、塞橡

塞、秒表、镊子、手术刀、离心管等。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 重复低氧小鼠模型的建立

将实验小鼠放入 250 mL 的透明广口瓶中,塞紧橡胶塞,立刻计时并观察小鼠的呼吸状态。当小鼠达到低氧非致死状态时,即小鼠出现仰式呼吸,大口喘气,出现痉挛。迅速拔下橡胶塞,快速取出小鼠,记录时间,该小鼠为低氧 1 次,低氧 1 次组的小鼠模型构建成功,实验结束。若是低氧 4 次组的小鼠则继续重复上述步骤,取出小鼠后,记录时间,待小鼠由仰式呼吸转为背式时,再次迅速放入广口瓶中进行重复低氧,共 4 次。本实验将低氧 1 次和低氧 4 次后即刻处死的小鼠记为 0 天低氧组(H1-0, H4-0);低氧后 1 天处死的小鼠记为 1 天低氧组(H1-1, H4-1);低氧后 2 天处死的小鼠记为 2 天低氧组(H1-2, H4-2);低氧后 3 天处死的小鼠记为 3 天低氧组(H1-3, H4-3);低氧后 4 天处死的小鼠记为 4 天低氧组(H1-4, H4-4);未低氧直接处死的小鼠记为对照组(H0-0)。小鼠处死后,立即剥离小鼠左右海马,放入 1.5 mL 的 EP 管中并标记,然后冻存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中。

#### 1.3.2 Real-time PCR

使用 Trizol 法提取总 RNA,在装有小鼠海马组织的 EP 管内加入 300  $\mu\text{L}$  TRIzol 液,用匀浆仪研磨 20 下,形成粉红色的匀浆。再加入 200  $\mu\text{L}$  液并用注射器上下吸打 10 次,将匀浆样品放置在冰上 5 min,放入离心机离心(12000 r/min,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 min)。取上清加入 100  $\mu\text{L}$  氯仿(氯仿:TRIzol=0.2:1),温和上下混匀 20 次,室温放置 15 min,再离心(13000 r/min,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 min)。取上清于新 EP 管中并标记,加入 250  $\mu\text{L}$  预冷异丙醇(异丙醇:TRIzol=0.5:1),上下混匀 20 次并离心(13000 r/min,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min),离心后弃除上清即出现贴壁的 RNA。加入 1 mL 75% 预冷酒精洗涤 RNA 沉淀用手指弹 EP 管,使 RNA

漂起。1000 r/min,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 min 离心,弃上清,室温干燥 RNA 沉淀。最后加入 25  $\mu\text{L}$  无酶水回融,测 OD 值。使用 First Strand Cdna Synthesis 试剂盒(Thermo 公司)将总 RNA 逆转录为 cDNA,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。引物由生物工程(上海)有限公司合成,BDNF 基因、TrkB 基因和  $\beta$ -Actin 基因引物的设计见表 1。在 96 孔板(ABI 公司)加入 3  $\mu\text{L}$  cDNA Template, 1  $\mu\text{L}$  primer, 10  $\mu\text{L}$  Mix 以及高压水 6  $\mu\text{L}$  共 20  $\mu\text{L}$ ,每个待测样品需重复 3 个空,3000 r/min, 10 min 离心。放入 ABI7900HT Real-time PCR 仪中,反应条件为  $50^{\circ}\text{C}$  2 min;  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $95^{\circ}\text{C}$  30 s,  $59^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 40 个循环,  $72^{\circ}\text{C}$  2 min 延伸。

#### 1.3.3 Western blot 电泳

总磷酸化的 TrkB(分子量为  $140 \times 10^3$ )需配配制 6% 的分离胶;位点磷酸化的 TrkB 及 TrkB(分子量分别为  $90 \times 10^3$ ,  $95 \times 10^3$ )需配 8% 的分离胶;BDNF(分子量为  $14 \times 10^3$ )需配 12% 的分离胶,5% 的浓缩胶。TrkB 蛋白加样量为 20  $\mu\text{g}$ , BDNF 蛋白的加样量为 30  $\mu\text{g}$ 。电泳浓缩胶恒流 49 mA;分离胶恒流 39 mA。转膜,恒流 400 mA, BDNF 1 小时, TrkB 蛋白 2-3 h。封闭,除了位点磷酸化的 TrkB 需用 0.5% 胎牛血清封闭外,其他蛋白均用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h; TBST 洗膜 10/次, 3 次。孵育一抗,一抗在  $4^{\circ}\text{C}$  摇床上孵育过夜。二抗孵育,二抗室温 300 rpm 摇床上孵育 2 h。显影,用等体积的超敏发光液 A 液和 B 液浸泡膜,曝片(自动化学发光成像分析系统 Tanon 5800)。

### 1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 统计软件,运用的统计学方法为方差分析(ANOVA)和  $t$  检验,比较了相同低氧次数不同天数处死组及相同天数处死不同低氧次数组之间的差异,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  为差异有显著性。

表 1 基因引物序列  
Table 1 Gene primer sequences

引物名称 Primer names	引物序列(5'→3') Primer Sequences	片段大小(bp) Fragment size
BDNF-forward	TCTGACGACGGACATCGGC	172
BDNF- reverse	CCAGCAGAAAGAGTAGAGGAGGC	
TrkB- forward	GAGCTGCTGACCAACCTCCA	105
TrkB- reverse	GTCCCGTGTTCATGTACTCA	
TrkBT- forward	TAAGATCCCACTGGATGGGTAG	126
TrkBT- reverse	AAGCAGCACTTCTGGGATA	
$\beta$ -Actin- forward	AGGTGAAGGTCCGAGTCA	268
$\beta$ -Actin- reverse	GGTCATGATGCCAACAA	

## 2 结果

### 2.1 重复低氧后可以提高小鼠低氧耐受时间

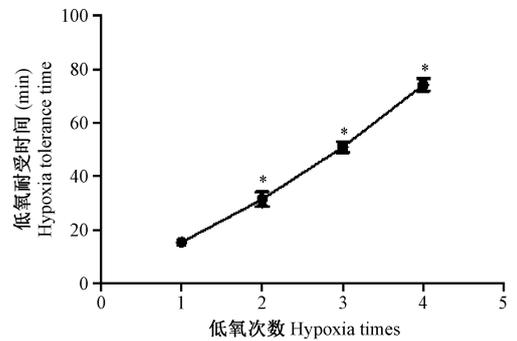
小鼠经低氧处理后,其低氧耐受时间随着低氧次数的增加而增加,图 1 显示,后一次耐受时间比前一次耐受时间更明显( $P < 0.05$ )。说明低氧模型和 HPC 模型构建成功。

### 2.2 低氧预适应在早期相上调小鼠海马中 BDNF 的表达

与对照组相比,急性低氧组和 HPC 组小鼠海马中 BDNF 在 mRNA 水平的表达都有增加的趋势(图 2A)。而 BDNF 在 HPC 早期相(即低氧预适应处理后 1 天),相较于对照组其蛋白水平表达显著升高( $P < 0.05$ )(图 2B);但在晚期相,BDNF 蛋白表达上调的并不明显。因此,BDNF 可能在 HPC 的早期通过表达上调发挥其神经保护作用。

### 2.3 低氧预适应小鼠海马中全长型 TrkB 的表达有上调的趋势

与对照组相比,急性低氧早期相小鼠海马中的全长型 TrkB mRNA 和蛋白表达均有降低的趋势,而



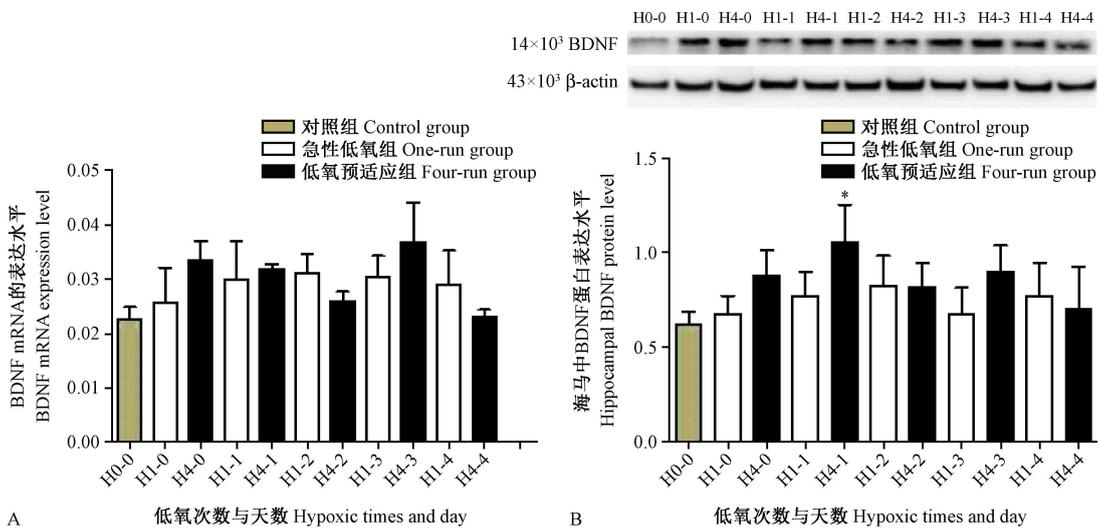
注:与前一次低氧组相比,\*  $P < 0.05$ 。

图 1 小鼠不同低氧次数的耐受时间记录

Note. Compared with the previous hypoxia group, \*  $P < 0.05$ .

Figure 1 Tolerance timepoints of hypoxia in mice

中期相 mRNA 表达变化不明显(图 3A),晚期相蛋白表达变化不明显(图 3B)。相较于对照组,HPC 早期相小鼠海马中的全长型 TrkB mRNA 和蛋白表达均有增加的趋势;但在晚期相 mRNA 表达变化不明显(图 3A),中期相蛋白表达变化不明显(图 3B)。因此,全长型 TrkB 可能在低氧预适应的早期



注:H0-0:未低氧直接处死的小鼠(对照组);H1-0、H4-0:分别为低氧 1 次和低氧 4 次后即刻处死的小鼠(0 天低氧组);H1-1、H4-1:分别为低氧 1 次和低氧 4 次后 1 天处死的小鼠(1 天低氧组);H1-2、H4-2:分别为低氧 1 次和低氧 4 次后 2 天处死的小鼠(2 天低氧组);H1-3、H4-3:分别为低氧 1 次和低氧 4 次后 3 天处死的小鼠(3 天低氧组);H1-4、H4-4:分别为低氧 1 次和低氧 4 次后 4 天处死的小鼠(4 天低氧组)。下图同。与对照组相比,\*  $P < 0.05$ 。

图 2 BDNF 的 Real time PCR 和 Western blot 检测结果

Note. H0-0: mice not directly killed by hypoxia (control group); H1-0, H4-0: mice killed immediately after hypoxia once or hypoxia four times (0-day hypoxia group); H1-1, H4-1: mice killed one day after hypoxia once or hypoxia four times, respectively (1-day hypoxia group); H1-2, H4-2: mice killed two days after hypoxia once or hypoxia four times, respectively. Mice (2-day hypoxia group); H1-3, H4-3: mice were killed 3 days after hypoxia once or hypoxia four times, respectively (3-day hypoxia group); H1-4, H4-4: mice were killed 4 days after hypoxia once or hypoxia four times, respectively (4-day hypoxia group). The same in the following figures. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ .

Figure 2 The results of BDNF real-time PCR and Western blot

相表达增加, 并可能改变 BDNF/TrkB 信号通路的活性。

### 2.4 低氧预适应在中晚期相下调小鼠海马中截短型 TrkB 的表达

与对照组相比, 低氧组截短型 TrkB 受体表达则有降低的趋势, 在 HPC 中, 晚期相(即低氧预适应处理后 2、4 天)其 mRNA 表达显著降低( $P < 0.05$ )(图 4A), 但截短型 TrkB 蛋白表达有降低的趋势但差异无显著性(图 4B)。因此, 截短型 TrkB 可能在 HPC 的中晚期相表达下调, 也有可能影响 BDNF/TrkB 信号通路的活性。

### 2.5 低氧抑制小鼠海马中 BDNF/TrkB 信号通路的活性, 而低氧预适应晚期相可激活信号通路

在 HPC 中 BDNF 与 TrkB 受体表达均发生变化, 很有可能其信号通路活性也会随之变化, 因此我们又检测了低氧和 HPC 情况下 BDNF/TrkB 信号通路的活性。与对照组相比, 急性低氧组 BDNF/TrkB 信号通路活性明显的被抑制( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ), 而 HPC 组 BDNF/TrkB 信号通路活性有增加的趋势, 且在晚期相(即低氧预适应处理后 4 天)( $P < 0.05$ )(图 5)。因此, HPC 在晚期相可能通过激活 BDNF/TrkB 信号通路发挥神经保护作用。

### 3 讨论

目前研究发现 HPC 是机体在非致死性缺氧状态下产生的内源性保护机制。HPC 可能是通过上

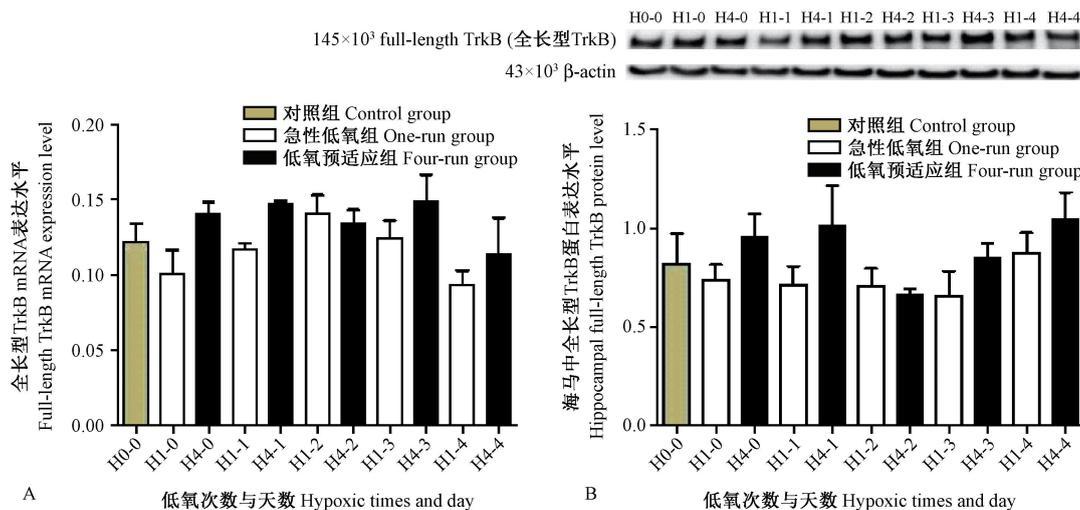
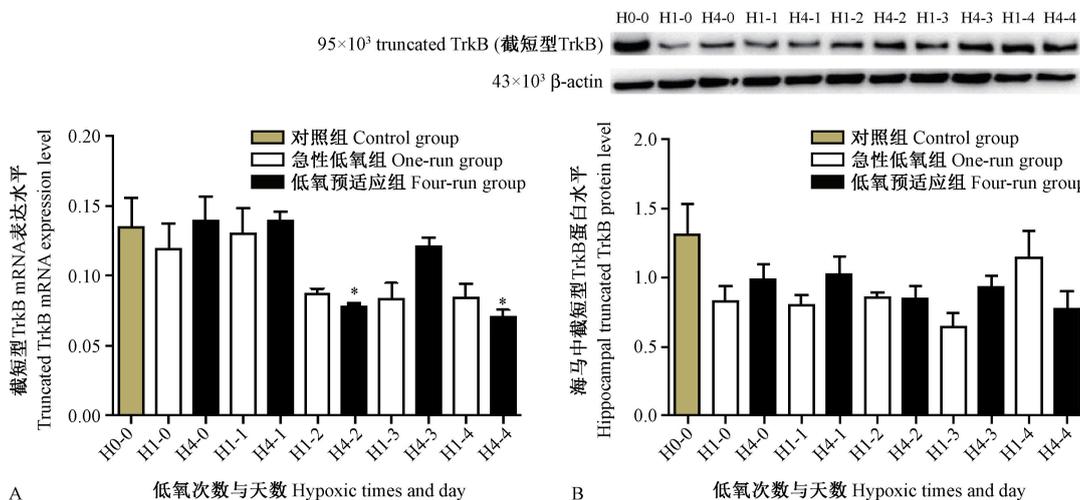


图 3 全长型 TrkB 的 Real time PCR 和 Western blot 结果

Figure 3 The results of full-length TrkB real-time PCR and Western blot

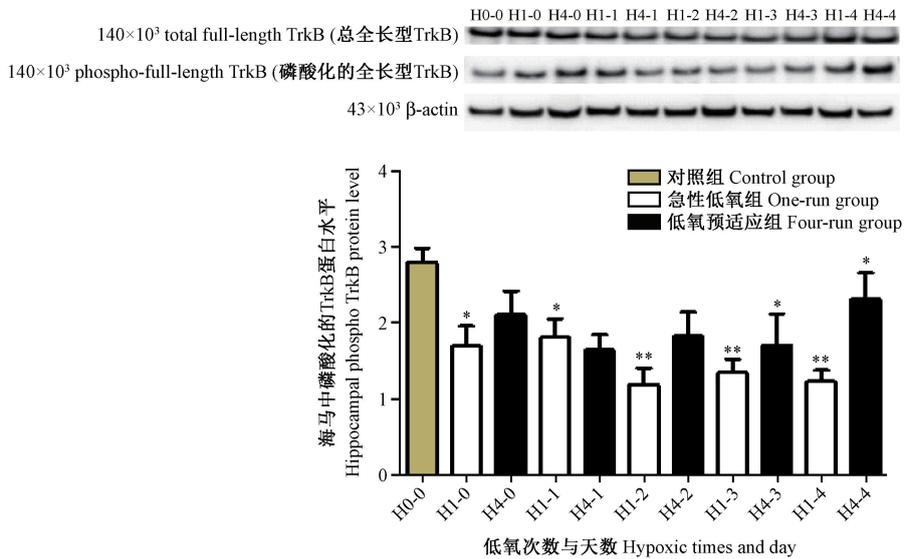


注: 与对照组相比, \*  $P < 0.05$ 。

图 4 截短型 TrkB 的 Real time PCR 和 Western blot 检测结果

Note. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ .

Figure 4 The results of truncated TrkB real-time PCR and Western blot



注:与对照组相比,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ 。

图5 磷酸化的 TrkB 蛋白的 Western blot 结果

Note. Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 5 The Western blot results of phospho-TrkB protein

调保护性因子表达,或下调损伤性因子表达,从而达到内源性保护作用。如在神经系统,HPC 可通过下调 NR2B、HESC 等因子产生神经保护<sup>[8-9]</sup>,HPC 通过高表达 Bcl-2、Caspase-3、PKC、CaveOLI-3 等因子产生保护作用<sup>[5-10]</sup>。但是分子机制仍未明确。而我们通过构建低氧和 HPC 小鼠模型,也是为了探索其中发挥作用的保护性因子及相关机制,以上实验也证实了小鼠低氧耐受时间随着低氧次数的增加有上升的趋势( $P < 0.05$ ),表明模型构建成功,一些因子表达可能发生变化,从而增加小鼠低氧耐受时间。

BDNF 广泛分布于中枢神经系统内,能调节神经元的分化和突触可塑性,尤其是对小脑海马结构的发育起到中要的作用<sup>[11]</sup>。Sciesielski 等发现小鼠 HPC 时可以刺激神经细胞中的 BDNF 表达上调<sup>[12]</sup>。最新研究发现体内 BDNF 表达受缺氧环境的影响,并且它参与了神经保护和修复的机制<sup>[13]</sup>。我们研究也发现急性低氧组和低氧预适应组小鼠海马中的 BDNF 表达都有增加的趋势,并且 HPC 组的 BDNF 蛋白表达在早期相增高显著( $P < 0.05$ )。因此 BDNF 可能通过在早期相的高表达参与了 HPC 的神经保护机制。

TrkB 是 BDNF 的特异性受体,其主要分为两大亚型,即全长型的 Trk B 受体( $140 \times 10^3$ )和截短型 TrkB 受体( $90 \times 10^3$ ),前者与 BDNF 结合可正常激活

BDNF/TrkB 信号通路,后者可通过异二聚体抑制 BDNF/TrkB 信号通路活性<sup>[14]</sup>。BDNF/TrkB 信号通路激活后可以改善神经功能、减少梗死体积以及修复受损神经元<sup>[15]</sup>。Tian 等在海马神经元缺氧研究中提出急性低氧时海马中 TrkB 的表达量出现降低的趋势<sup>[16]</sup>。而小鼠经多次低氧后,TrkB 受体促使其配体 BDNF 结合,对后期神经元的损伤进行修复并增加存活率<sup>[17]</sup>。我们研究发现 HPC 后全长型 TrkB 表达有增加的趋势,而截断型 TrkB 的 mRNA 表达在晚期相显著降低,由于 mRNA 表达变化发生在 HPC 晚期,所以截短型 TrkB 在蛋白水平表达的显著变化我们未能观察到,可能在 HPC 的更晚时间其表达才会发生显著差异。这有待于我们继续通过实验来证实。由此可见,HPC 一方面可能上调全长型的 TrkB 受体表达,另一方面下调截短型 TrkB 受体表达,都可能影响 BDNF/TrkB 信号通路的活性。

既然小鼠 HPC 可导致 BDNF 和 TrkB 受体表达变化,而 BDNF 和 TrkB 受体结合后激活信号通路,因此 HPC 的保护作用可能是通过 BDNF/TrkB 信号通路活性变化而实现的。因此我们进一步研究了 BDNF/TrkB 信号通路活性在 HPC 状态下的变化情况。前人研究发现低氧抑制 BDNF/TrkB 信号通路,当加入  $\delta$ -阿片受体激活剂,该信号通路从新被激活,进而细胞的凋亡和线粒体膜电位抑制得到了改

善<sup>[9-16]</sup>。本实验也发现,与对照组相比。急性低氧组 BDNF/TrkB 信号通路被抑制,与急性低氧组相比,HPC 后磷酸化的 TrkB 表达有升高的趋势,尤其在晚期相(低氧预适应 4 天后)显著增加( $P < 0.05$ )。由此我们猜测 HPC 是通过增加 BDNF 表达,促使 BDNF 与其受体结合,从而使 TrkB 酪氨酸残基磷酸化,信号通路被激活,以及 HPC 使截短型 TrkB 表达下调,异二聚体减少,进而减少了对信号通路的抑制,在这两种机制的共同作用下,激活 BDNF/TrkB 信号通路,通过调控神经元损伤和修复、增加神经突触性以及监视神经元病理状态等方面对大脑产生了保护作用。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Fu S, Dong S, Zhu M, et al. VEGF as a trophic factor for Müller glia in hypoxic retinal diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1(4): 473-478.
- [ 2 ] Falck M, Osredkar D, Maes E, et al. Hypothermia is neuroprotective after severe hypoxic-ischaemic brain injury in neonatal rats pre-exposed to PAM3CSK4 [J]. *Dev Neurosci*, 2018, 6(1): 1-9.
- [ 3 ] Cho Y, Shin J E, Ewan E E, et al. Activating injury-responsive genes with hypoxia enhances axon regeneration through neuronal HIF-1 $\alpha$  [J]. *Neuron*, 2015, 88(4): 720-734.
- [ 4 ] 侯林, 许晟迪, 张柱霞, 等. Hamartin 在低氧/缺血耐受中的作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(8): 85-88.
- [ 5 ] Wang W, Wang Y, Deng G, et al. Transplantation of hypoxic-preconditioned bone mesenchymal stem cells retards intervertebral disc degeneration via enhancing implanted cell survival and migration in rats [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018(2): 41-59.
- [ 6 ] Miller JK, Mcdougal S, Thomas S, et al. The impact of the brain-derived neurotrophic factor gene on trauma and spatial processing [J]. *J Clin Med*, 2017, 6(12): 108-119.
- [ 7 ] Ye X, Yu L, Zuo D, et al. Activated mGluR5 protects BV2 cells against OGD/R induced cytotoxicity by modulating BDNF-TrkB pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 654: 70-79.
- [ 8 ] Namazi H, Ghiasi P, Namazi I, et al. Exosomes secreted by normoxic and hypoxic cardiosphere-derived cells have anti-apoptotic effect [J]. *Iran J Pharm Res*, 2017, 17(1): 58-69.
- [ 9 ] Zhong J B, Li X, Zhong S M, et al. Knockdown of long noncoding antisense RNA brain-derived neurotrophic factor attenuates hypoxia/reoxygenation-induced nerve cell apoptosis through the BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Neuroreport*, 2017, 28(14): 910-921.
- [ 10 ] Yu H, Yang Z, Pan S, et al. Hypoxic preconditioning promotes the translocation of protein kinase C $\epsilon$  binding with caveolin-3 at cell membrane not mitochondrial in rat heart [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(22): 3557-3565.
- [ 11 ] Lavezzi AM, Ferrero S, Lattuada D, et al. Pathobiological expression of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebellar cortex of sudden fetal and infant death victims [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2017, 23(66): 9-17.
- [ 12 ] Sciesielski LK, Paliege A, Martinka P, et al. Enhanced pulmonary expression of the TrkB neurotrophin receptor in hypoxic rats is associated with increased acetylcholine-induced airway contractility [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009, 197(3): 253-264.
- [ 13 ] Lima-Ojeda JM, Mallien AS, Brandwein C, et al. Altered prepulse inhibition of the acoustic startle response in BDNF-deficient mice in a model of early postnatal hypoxia: implications for schizophrenia [J]. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2018, 1(1): 1-9.
- [ 14 ] Sui WH, Huang SH, Wang J, et al. Myosin Va mediates BDNF-induced postendocytic recycling of full-length TrkB and its translocation into dendritic spines [J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(6): 1108-1122.
- [ 15 ] Luo J, Zheng H, Zhang L, et al. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) improves functional recovery by enhancing neurogenesis and activating BDNF/TrkB signaling in ischemic rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): 455-467.
- [ 16 ] Tian X, Hua F, Sandhu H, et al. Effect of  $\delta$ -opioid receptor activation on BDNF-TrkB vs. TNF- $\alpha$  in the mouse cortex exposed to prolonged hypoxia [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(8): 59-76.
- [ 17 ] Narumiya S, Ohno M, Tanaka N, et al. Enhanced expression of full-length TrkB receptors in young rat brain with hypoxic/ischemic injury [J]. *Brain Research*, 2017, 797(2): 278-286.

[ 收稿日期 ] 2018-07-13