

首发儿童精神分裂症患者脑源性神经营养因子水平及神经元凋亡研究

杨俊¹, 佟靓², 周立国^{2*}

(1. 大理州第二人民医院, 云南 大理 671000;

2. 云南省精神病医院, 云南 昆明 650101

* 通信作者: 周立国, E-mail: 13388844577@139.com)

【摘要】目的 探讨首发儿童精神分裂症患者脑源性神经营养因子(BDNF)、 β -微管蛋白 III(Tuj-1)、胱天蛋白酶 3(Caspase-3)的变化,为揭示儿童精神分裂症的病因和发病机制提供参考。**方法** 以 2015 年 8 月-2018 年 3 月在大理州第二人民医院就诊的符合《精神障碍诊断与统计手册(第 4 版)》(DSM-IV)诊断标准的儿童精神分裂症患者($n=35$)为研究组,同期在大理州第二人民医院的体检儿童中随机选取健康儿童为对照组($n=30$)。通过实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定两组儿童血液中 BDNF、Caspase-3 和 Tuj-1 的 mRNA 表达水平。**结果** 与对照组相比,研究组 BDNF 和 Tuj-1 mRNA 表达低($P<0.05$ 或 0.01),Caspase-3 mRNA 表达高($P<0.01$)。**结论** 儿童精神分裂症患者的 BDNF mRNA 和 Tuj-1 mRNA 表达少,Caspase-3 mRNA 表达多,BDNF mRNA、Tuj-1 mRNA 和 Caspase-3 mRNA 可能与儿童精神分裂症相关。

【关键词】 脑源性神经营养因子;精神分裂症;儿童;凋亡;神经元

中图分类号:R749.3

文献标识码:A

doi:10.11886/j.issn.1007-3256.2019.02.009

Brain-derived neurotrophic factor level and neuronal apoptosis in first-episode schizophrenia in children

Yang Jun¹, Tong Liang², Zhou Ligu^{2*}

(1. The Second People's Hospital of Dali Prefecture, Dali 671000, China;

2. Psychiatric Hospital of Yunnan Province, Kunming 650101, China

* Corresponding author: Zhou Ligu, E-mail: 13388844577@139.com)

【Abstract】Objective To investigate the changes of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), class III β -tubulin (Tuj-1) and Caspase-3 levels in first-episode schizophrenic children, so as to provide references for revealing the etiology and pathogenesis of schizophrenia. **Methods** 35 cases of schizophrenic children (study group) met the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition (DSM-IV) and 30 cases of healthy children (control group) in the Second People's Hospital of Dali Prefecture from August 2015 to March 2018 were selected. Then the mRNA levels of BDNF, Caspase-3 and Tuj-1 were detected in both groups by quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The study group had higher Caspase-3 mRNA expression level ($P<0.01$) as well as lower BDNF and Tuj-1 ($P<0.05$ or 0.01) mRNA expression levels than those of the control group. **Conclusion** The BDNF and Tuj-1 mRNA expression levels are down-regulated, meanwhile the Caspase-3 mRNA expression level is up-regulated in schizophrenic children, indicating that the three indicators may be related to the onset of schizophrenia.

【Keywords】 Brain-derived neurotrophic factor; Schizophrenia; Children; Apoptosis; Neurons

儿童精神分裂症具有起病年龄小、易反复发作、治疗难度大、预后差的特点,严重影响患者身心健康^[1]。精神分裂症的病因学研究指出,神经发育障碍是精神分裂症发病的重要影响因素。精神分裂症患者存在脑室扩大、脑沟变宽、海马体积缩小、脑体积减小等颅脑异常^[2]。Sporn 等^[3]研究显示,儿童精神分裂症患者的脑灰质和脑体积较健康儿童小,

且其脑灰质密度降低早于精神分裂症的症状出现,精神分裂症患者的脑发育异常在胎儿期就已出现,主要表现为脑室扩大,这种病理改变贯穿于童年期^[4]。脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是神经发生蛋白,是神经可塑性的重要调节因子^[5-6],BDNF 表达减少可引起内嗅皮质、额叶皮质、海马和扣带回细胞结构紊乱,破坏神经元的交互对话,导致颅脑发育异常^[7],BDNF 对神经元的生物学作用提示其可能是精神分裂症发病的影响因素。 β III 型微管蛋白(β -III-tubulin,

项目基金:昆明市卫生和计划生育委员会医药卫生科技项目(2018-03-09-004);昆明市卫生科技人才培养项目暨“千百千”工程[2018-SW(后备人选)-89]

Tuj-1)是一种参与神经元细胞类型特异性分化的微管蛋白,在神经元突触分化时表达增加,参与神经元的交互对话^[8]。当神经元受损、突触分化障碍时,Tuj-1 表达水平降低,Tuj-1 可作为神经元突触分化的特异性标志物^[9]。在细胞凋亡进程中,胱天蛋白酶 3(Caspase-3)被激活提示细胞凋亡已进入不可逆阶段,有研究指出,Caspase-3 作为神经元凋亡相关指标在神经元轻微损伤时表达就会增加^[10]。基于精神分裂症的颅脑病变特点及 BDNF 对神经元的调节作用,本研究探索 BDNF、神经元标志物 Tuj-1 和凋亡标志物 Caspase-3 在儿童精神分裂症中的变化,为揭示儿童精神分裂症的病因和发病机制提供参考。

1 对象与方法

1.1 对象

以 2015 年 8 月-2018 年 3 月在大理州第二人民医院就诊的儿童精神分裂症患者为研究组。纳入标准:①符合《精神障碍诊断与统计手册(第 4 版)》(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition, DSM-IV)精神分裂症诊断标准;②年龄 3~12 岁;③既往未经任何治疗的首发患儿,无系统精神类药物应用史;④汉族;⑤无心、肝、肾等器质性疾病。排除标准:①合并脑炎、癫痫、多发性硬化、精神发育迟滞等神经系统器质性疾病者;②有颅脑外伤病史者。符合纳入标准且不符合排除标准共 35 例。同期采用计算机随机法从在大理州第二人民医院体检的儿童中选取 30 例年龄、性别、受教育程度与研究组匹配的健康儿童为对照组。纳入标准:①年龄 3~12 岁;②汉族;③无心、肝、肾等器质性疾病。排除标准:①合并脑炎、癫痫、多发性硬化、精神发育迟滞等神经系统器质性疾病者;②有颅脑外伤病史者;③二系三代有精神病家族史或自杀史者。本研究经大理州第二人民医院伦理委员会审核批准。研究对象均由其监护人签署知情同意书。

1.2 BDNF、Caspase-3 和 Tuj-1 的 mRNA 检测

所有儿童于入组当日 08:00-10:00 由护士抽取空腹静脉血 5 mL 置于抗凝管中作为标本。用 Trizol 裂解液提取总 RNA 后于 -80℃ 保存,将总 RNA 逆转录为 cDNA,再进行 cDNA 扩增。

使用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA。

逆转录体系 50 μL:5 × PrimeScript Buffer 10 μL, Oligo(dT) primer (50 μM) 2.5 μL, Prime Script RT Enzyme MixI 2.5 μL, Random 6 mers(100 μM) 2.5 μL, Total RNA 2.5 μL, RNase Free ddH₂O 30 μL。RNA 逆转录条件:① 37℃, 15 min, 然后进行;② 85℃, 5 s, 最后进行;③ 4℃, forever。在 cDNA 中加入引物后进行扩增, RT-PCR 反应体系 20 μL: cDNA 1 μL, Primer1 0.5 μL, Primer2 0.5 μL, Mix 10 μL, RNase Free ddH₂O 8 μL。RT-PCR 顺序反应条件:① 50℃, 2 min, ② 95℃, 2 min, ③ 95℃ 15s, 60℃ 1min 该步骤进行 40 个循环, ④ 95℃, 15 s, ⑤ 60℃, 30 s, ⑥ 95℃, 15 s。每个样本做 3 个重复。BDNF、Caspase-3、Tuj-1 基因引物由美国英杰(Invitrogen)生物公司合成。BDNF:上游引物:5'-CAGAGGAGCCAGC-CCGGTGC-3', 下游引物:5'-CTCCTGCAC-CAAGCCCCATTC-3'。Caspase-3:上游引物:5'-ACCGATGTCGATGCAGCTAA-3'; 下游引物:5'-GGTGCGGTAGAGTAAGCATA-3'。GAPDH:上游引物:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'; 下游引物:5'-TTGGCTCCACCCCTTCAAGTG-3'。Tuj-1:上游引物:5'-CCATCTAGCTACTGACACTG-3'; 下游引物:5'-AAGTGGACTCACATGGAGTG-3'。本研究所有实验均重复 3 次。

1.3 设备与试剂

Trizol 裂解液购买于美国西格玛(Sigma)生物公司。逆转录试剂盒购买于日本他卡若生物公司。PCR 扩增仪购于美国伯乐公司,型号 Tetrad2。RT-PCR 系统购于美国应用生物系统公司,型号 7300。

1.4 统计方法

使用 SPSS 17.0 进行统计分析。计数资料用例数表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用成组 *t* 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

研究组年龄(8.31 ± 2.16)岁;男生 18 例,女生 17 例;小学 19 例,学龄前 16 例。对照组年龄(9.02 ± 1.76)岁;男生 15 例,女生 15 例;小学 16 例,学龄前 14 例。

2.2 两组 BDNF mRNA、Caspase-3 mRNA 和 Tuj-1 mRNA 表达水平比较

研究组 BDNF mRNA 和 Tuj-1 mRNA 表达水平均低于对照组, Caspase-3 mRNA 表达水平高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 0.01)。见表 1、图 1。

表 1 两组 BDNF mRNA、Caspase-3 mRNA 和 Tuj-1 mRNA 表达比较 $\bar{x} \pm s$

组别	BDNF mRNA	Caspase-3 mRNA	Tuj-1 mRNA
研究组 ($n = 35$)	0.640 ± 0.397	3.878 ± 1.844	0.868 ± 0.389
对照组 ($n = 30$)	1.005 ± 0.519	1.080 ± 0.527	1.082 ± 0.274
<i>t</i>	2.844	8.022	2.510
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.05

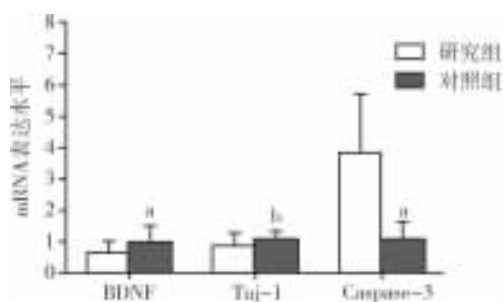


图 1 两组 BDNF mRNA、Caspase-3 mRNA 和 Tuj-1 mRNA 表达比较

3 讨 论

儿童精神分裂症是较常见的儿童精神疾病, 与神经发育异常关系密切。精神分裂症与神经元的变性、凋亡密切相关, 其特异性症状、认知缺陷的持续进展及治疗效果较差可能与神经细胞的功能下降有关。儿童及青少年阶段是神经细胞快速增殖、生长时期, 这一时期神经细胞发生大量凋亡必将影响儿童的脑组织生长和发育, 从而导致一系列神经及精神问题。

本研究显示, 儿童精神分裂症患者 Tuj-1 表达较健康儿童低。Tuj-1 是一种微管蛋白, 是神经元的特异性抗原之一。研究显示^[11-12], 在大脑发育过程中, 神经干细胞分化为神经元是一个循序渐进的过程, 分别经历了神经干细胞、神经祖细胞、神经母细胞、不成熟神经元和成熟神经元阶段。在此过程中, Tuj-1 的表达增加提示神经元正处于发展和成熟的过程, Tuj-1 表达减低提示神经元减少^[13]。本研究中患儿 Tuj-1 表达降低, 提示精神分裂症患者脑内神经元减少、受损或死亡。

万方数据

Caspase-3 是细胞凋亡下游的关键执行者之一, 其表达上调提示凋亡蛋白表达增加, 即凋亡的细胞数量增加。本研究显示, 精神分裂症患者 Caspase-3 表达较健康儿童高, 提示精神分裂症患者脑内凋亡的神经元数量较正常儿童多。

本研究中, 研究组 BDNF mRNA 表达低于对照组, 推测 BDNF 表达减少后神经元失去相应滋养, 从而导致神经元凋亡, 产生功能缺损, 表现出精神分裂症的一系列症状。神经营养因子在神经元的发生、发育、成熟及凋亡过程中均发挥重要调节作用, 对中枢和外周神经元的存活起到支撑作用^[14-15]。BDNF 表达于大脑皮层、海马、纹状体等与精神分裂症发病相关的脑区, 对新神经元的发生、发育和存活具有调控作用, 对发育成熟神经元的功能维持具有保护作用^[16-17], BDNF 表达降低会产生一系列颅脑发育异常及神经精神障碍^[18]。本研究结果显示, 精神分裂症患者 BDNF 表达减少, 与既往研究结果一致。

综上所述, 儿童精神分裂症患者 BDNF mRNA 和 Tuj-1 mRNA 表达减少, Caspase-3 mRNA 表达增加, 推测 BDNF、Tuj-1 和 Caspase-3 可能与儿童精神分裂症的发病相关。本研究的局限性在于: 仅观察 35 例首发精神分裂症患者的 BDNF、Tuj-1 及 Caspase-3 的 mRNA 表达变化, 且未对 mRNA 转录的蛋白质进行研究, 在今后的研究中应扩大样本量, 同时对相关转录因子及转录后蛋白进行研究, 并进一步探讨 BDNF 表达减少、神经元凋亡后神经元的功能及交互对话, 以揭示儿童精神分裂症的病因和发病机制。

参考文献

- [1] 曹阳, 康传媛, 万帅, 等. 儿童青少年期起病精神分裂症患者的临床特征与认知功能的关系[J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 11(4): 379-383.
- [2] 朱俊敬, 郭素芹, 梁颖慧, 等. 首发儿童精神分裂症患者行为特征与颅脑结构的关系[J]. 中国学校卫生, 2018, 39(7): 1018-1021.
- [3] Sporn AL, Greenstein DK, Gogtay N, et al. Progressive brain volume loss during adolescence in childhood-onset schizophrenia [J]. Am J Psychiatry, 2003, 160(12): 2181-2189.
- [4] Lieberman JA. Pathophysiologic mechanisms in the pathogenesis and clinical course of schizophrenia [J]. J Clin Psychiatry, 1999, 60(Suppl 12): 9-12.
- [5] 牛莉莉, 温科奇, 熊鹏, 等. 首发精神分裂症治疗前后血清 NGF、BDNF、GFAP 与临床症状的相关性研究[J]. 精神医学

- 杂志, 2015, 28(1): 10-12.
- [6] 王云香. 精神分裂症患者血清 BDNF、GDNF 水平与认知功能的改变及抗精神药物和物理治疗对其的影响[J]. 中国健康心理学杂志, 2017, 25(10): 1457-1460.
- [7] 平军娇, 邓顺顺, 万静, 等. 伴与不伴抑郁症状的首发精神分裂症患者脑源性神经营养因子、同型半胱氨酸及 C-反应蛋白水平比较[J]. 新乡医学院学报, 2018, 35(8): 697-700.
- [8] 李雪, 李峰. 神经元常见标记物及其应用[J]. 继续医学教育, 2018, 32(5): 133-135.
- [9] 杨伟伟, 李浩明, 金国华, 等. 海马胆碱能刺激肽促进神经干细胞向神经元分化[J]. 四川解剖学杂志, 2014, 22(3): 5-8, 12.
- [10] 李学涵, 刘学良, 王平, 等. OGD 动态处理后大鼠海马神经元线粒体裂解及凋亡相关蛋白的变化[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2018, 39(6): 793-797, 820.
- [11] Zhang X, Hu M, Zhang L, et al. MTEP impedes the neuronal polarization and the activity of the Akt-NF- κ B pathway in rat hippocampal neurons[J]. J Neurosci Res, 2016, 95(9): 1730-1744.
- [12] 张凤兰, 杨璐军, 肖志成. 胎鼠不同脑组织中神经干细胞和神经元所占比例及差异[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(21): 3364-3369.
- [13] 史卫俊. 自噬调控神经干细胞的分化潜能[D]. 太原: 山西医科大学, 2015.
- [14] 刘文彬, 刘微娜, 漆正堂. 神经营养因子介导运动的抗抑郁作用[J]. 体育科学, 2018, 38(10): 54-66.
- [15] 代云飞, 王通通, 马微等. 神经生长因子、脑源性神经生长因子及其前体在神经系统中的效应[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(28): 4580-4586.
- [16] 肖文焕, 陈宽玉, 张晓斌, 等. 脑源性神经营养因子在精神分裂症发病机制及认知功能中的作用[J]. 临床精神医学杂志, 2016, 26(6): 425-426.
- [17] 段维维, 耿德勤, 唐小伟, 等. 脑源性神经营养因子与精神分裂症相关研究进展[J]. 国际精神病学杂志, 2015, 42(5): 51-53.
- [18] 李强, 李予春, 王翠鹏. 重复经颅磁刺激对首发精神分裂症患者血清脑源性神经营养因子的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2017, 20(15): 43-45.

(收稿日期: 2018-12-12)

(本文编辑: 吴俊林)