

CHẾ ĐỘ ĂN GIÀU CHẤT BÉO VÀ ĐƯỜNG TINH LUYỆN LÀM GIẢM YẾU TỐ DINH DƯỠNG THÂN KINH BDNF, TÍNH MỀM DẼO THÂN KINH VÀ KHẢ NĂNG HỌC TẬP CỦA VÙNG HẢI MÃ

R. Molteni, R. J. Barnard, Z. Ying, C. K. Roberts và F. Gómez-Pinilla

Khoa Khoa học Sinh lý, Đại học California tại Los Angeles

Bộ phận Phẫu thuật Thần kinh, Trung tâm Nghiên cứu Chấn thương Não UCLA, Los Angeles, CA 90095, Mỹ

Neuroscience, Tập 112, Số 4, tr. 803–814, 2002 | DOI: 10.1016/S0306-4522(02)00123-9

TÓM TẮT

Chúng tôi đã nghiên cứu một cơ chế tiềm năng mà qua đó chế độ ăn giàu chất béo bão hòa và đường tinh luyện (HFS) — tương tự chế độ ăn điển hình của hầu hết các xã hội công nghiệp phương Tây — có thể ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng não thông qua điều tiết các neurotrophin. Chúng tôi cho thấy rằng những con vật học nhiệm vụ trí nhớ không gian nhanh hơn có nhiều mRNA và protein BDNF (Yếu tố Dinh dưỡng Thân kinh Từ Não) hơn trong vùng hải mã. Hai tháng duy trì chế độ ăn HFS là đủ để làm giảm mức BDNF ở hải mã và hiệu suất học tập không gian. Các yếu tố trung gian xuôi dòng trong chức năng synapse của BDNF giảm tỷ lệ thuận với mức BDNF trong hải mã của chuột duy trì chế độ ăn HFS trong 2 đến 24 tháng. Cụ thể, những con vật duy trì chế độ ăn HFS cho thấy sự giảm về: (i) mRNA và protein synapsin I (toàn phần và phosphoryl hóa), quan trọng cho giải phóng chất dẫn truyền thần kinh; (ii) mRNA và protein CREB (toàn phần và phosphoryl hóa) — cần thiết cho nhiều dạng trí nhớ và chịu sự điều hòa của BDNF; (iii) mRNA của protein liên quan đến tăng trưởng 43 (GAP-43), quan trọng cho sự phát triển neurite, giải phóng chất dẫn truyền thần kinh, học tập và trí nhớ. Những thay đổi liên quan đến chế độ ăn đặc hiệu với hải mã và không ảnh hưởng đến neurotrophin-3 (NT-3), một thành viên khác của họ neurotrophin.

Kết quả của chúng tôi cho thấy rằng một chế độ ăn phổ biến có thể ảnh hưởng đến các khía cạnh quan trọng của tính mềm dẻo tế bào thần kinh và hành vi liên quan đến chức năng của BDNF.

Từ khóa: BDNF, chế độ ăn, tính mềm dẻo thần kinh, chức năng nhận thức, mê cung nước, hải mã.

1. GIỚI THIỆU

Ngày càng được công nhận rộng rãi rằng lối sống đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì chức năng thần kinh suốt đời. Đặc biệt, chế độ ăn điển hình của hầu hết các xã hội công nghiệp phương Tây, giàu chất béo bão hòa và đường tinh luyện (HFS) (Block và cộng sự, 1988), có thể góp phần gây suy giảm nhận thức trong quá trình lão hóa (Knopman và cộng sự, 2001) và có thể đẩy nhanh tiến triển của chứng mất trí nhớ trong bệnh Alzheimer (Kalmijn và cộng sự, 2000, 1997).

Mặc dù tác động tiềm năng của các yếu tố chế độ ăn đến chất lượng cuộc sống là rõ ràng, hầu hết các nghiên cứu hiện tại chỉ đánh giá ảnh hưởng của chúng đến tuổi thọ (Taubes, 2001). Người ta đã giả định rằng các tác động của chế độ ăn HFS lên chức năng thần kinh chủ yếu xuất phát từ rối loạn tim mạch như xơ vữa động mạch (Kalmijn và cộng sự, 2000), bỏ qua tác động trực tiếp của chế độ ăn lên não. Khả năng chế độ ăn HFS có thể ảnh hưởng đến chức năng thần kinh cho thấy rằng chế độ ăn có thể làm tăng tính dễ bị tổn thương đối với nhiều bệnh thần kinh và các thiếu hụt liên quan đến lão hóa.

Tính mềm dẻo thần kinh là khả năng quan trọng để bù đắp cho các thách thức, liên quan đến các cơ chế tế bào và phân tử trong hình thành và chức năng synapse, tăng trưởng neurite và thích nghi hành vi. Ở đây chúng tôi cung cấp bằng chứng rằng chế độ ăn HFS có thể làm giảm tính mềm dẻo thần kinh thông qua điều tiết BDNF. BDNF, một chất trung gian quan trọng của sức sống và chức năng tế bào thần kinh, đang nổi lên là một nhân tố chính trong các sự kiện thần kinh nên tăng cho việc học tập và trí nhớ.

Trong số các cơ chế mà BDNF ảnh hưởng đến tính mềm dẻo thần kinh, các phân tử như synapsin I, GAP-43 và CREB đóng vai trò trung tâm. Synapsin I điều hòa sự giải phóng chất dẫn truyền thần kinh qua trung gian BDNF bằng cách ảnh hưởng đến quá trình xuất bào của bóng synapse. GAP-43 có mặt trong các đầu tận axon đang phát triển và có vai trò quan trọng trong tăng trưởng axon, giải phóng chất dẫn truyền thần kinh, học tập và trí nhớ. CREB là một trong những yếu tố phiên mã được đặc trưng tốt nhất trong não, cần thiết cho nhiều dạng trí nhớ bao gồm học tập không gian, và sự phosphoryl hóa của nó chịu sự kiểm soát của BDNF.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Động vật và chế độ ăn

Nghiên cứu được thực hiện trên chuột cái Fisher 344 2 tháng tuổi (Harlan Sprague Dawley, Inc., San Diego, CA, Mỹ), được nuôi ở 22–24°C trong chu kỳ sáng/tối 12:12 giờ. Sử dụng chuột cái vì chúng không phát triển tăng huyết áp trong năm đầu tiên dùng chế độ ăn HFS và không biểu hiện xơ vữa động mạch. Sau 1 tuần thích nghi với thức ăn chuột tiêu chuẩn, chuột được phân ngẫu nhiên vào chế độ ăn HFS hoặc chế độ ăn ít béo, carbohydrate phức tạp (LFCC) trong 2 tháng, 6 tháng, hoặc 2 năm (n = 5–8 mỗi nhóm).

Chế độ ăn HFS giàu chất béo bão hòa và đơn không bão hòa (chủ yếu từ mỡ lợn và một lượng nhỏ dầu ngô, ~39% năng lượng) và giàu đường tinh luyện (sucrose, ~40% năng lượng). Chế độ ăn LFCC là chế độ ăn tiêu chuẩn được dùng trong hầu hết các cơ sở nuôi chuột, ít chất béo bão hòa (~13% năng lượng từ chất béo) và chứa carbohydrate phức tạp (tinh bột, 59% năng lượng).

2.2. Phân lập RNA và định lượng RT-PCR thời gian thực

RNA tổng số được phân lập bằng kit RNA STAT-60. Các mRNA của BDNF, synapsin, GAP-43 và CREB được đo bằng RT-PCR định lượng thời gian thực TaqMan sử dụng hệ thống phát hiện trình tự ABI PRISM 7700 và thuốc thử TaqMan EZ RT-PCR Core. Hệ thống phát hiện trực tiếp sự tăng huỳnh quang của đầu dò DNA gắn thuốc nhuộm đặc hiệu cho từng yếu tố cùng với đầu dò đặc hiệu cho gen GAPDH dùng làm đối chứng nội tại.

2.3. Đo lường protein

BDNF protein được phát hiện bằng xét nghiệm ELISA. Synapsin I, phospho-synapsin I, CREB và phospho-CREB được xác định bằng Western blot, định lượng bằng quét mật độ phim và chuẩn hóa theo mức actin. Màng được ủ với các kháng thể tương ứng: kháng synapsin I (1:2000), kháng phospho-synapsin I (1:2000), kháng CREB (1:1000), kháng phospho-CREB (1:1000) và kháng actin (1:2000).

2.4. Đánh giá hiệu suất nhận thức (mê cung nước Morris)

Ảnh hưởng của 1 và 2 tháng chế độ ăn lên chức năng nhận thức được đánh giá bằng mê cung nước trên một nhóm chuột riêng biệt (n = 16). Bể bơi (đường kính 130 cm, cao 50 cm) được chia thành bốn góc phân tư: nền tảng (P), trái nền tảng (L), phải nền tảng (R) và đôi diện (O). Chuột được huấn luyện trong mê cung nước với 10 thử nghiệm liên tiếp mỗi ngày trong 3 ngày. Thời gian định vị nền tảng được ghi lại và tính độ trễ trung bình. Để đánh giá khả năng lưu giữ trí nhớ không

gian, các bài kiểm tra thăm dò không gian được thực hiện 3 ngày sau ngày kiểm tra hành vi cuối cùng.

2.5. Phân tích thống kê

GAPDH và actin được dùng làm tiêu chuẩn nội tại. Kiểm định t của Student (hai đuôi, không ghép cặp) được sử dụng để so sánh hai nhóm. Phân tích hồi quy tuyến tính được thực hiện để đánh giá mối liên hệ giữa các biến. Phân tích phương sai (ANOVA) với đo lường lặp lại được thực hiện để phân tích dữ liệu từ các bài kiểm tra mê cung nước. Kết quả có ý nghĩa thống kê khi $P \leq 0,05$.

3. KẾT QUẢ

3.1. mRNA và protein BDNF

Mức BDNF mRNA trong hải mã của chuột ăn chế độ HFS giảm so với chuột ăn chế độ LFCC trong khoảng từ 2 đến 24 tháng. Mức BDNF mRNA thấp nhất đạt được sau 2 năm (Hình 1A). Sự giảm BDNF mRNA ở nhóm HFS đi kèm với sự giảm đáng kể protein BDNF đánh giá sau 6 tháng dùng chế độ ăn (Hình 1B). Sự giảm protein BDNF ảnh hưởng đến các vùng phụ hải mã cụ thể, như phân tích mô học cho thấy sự giảm định tính trong nhuộm miễn dịch BDNF ở CA3 và hồi răng (Hình 1D).

Không có thay đổi nào về BDNF mRNA liên quan đến chế độ ăn ở vỏ não đại não (Hình 1E). Chúng tôi đánh giá NT-3 trong mô hải mã để kiểm tra ảnh hưởng của chế độ ăn lên các thành viên khác của họ neurotrophin. Mức NT-3 mRNA không thay đổi ở chuột HFS ở tất cả các thời điểm kiểm tra (Hình 1F).

3.2. mRNA và protein synapsin I

Mức synapsin I mRNA ở hải mã thấp hơn ở chuột ăn chế độ HFS so với chuột ăn LFCC ở tất cả các thời điểm kiểm tra (Hình 2A). Phân tích Western blot thực hiện sau 6 tháng cho thấy sự giảm đáng kể synapsin I toàn phân (Hình 2C) và phospho-synapsin I (Hình 2G) trong hải mã của chuột ăn HFS. Hơn nữa, sự giảm BDNF tương quan thuận với sự giảm synapsin I ($r = 0,91$, $P \leq 0,01$; Hình 2D) hoặc phospho-synapsin I ($r = 0,95$, $P \leq 0,01$; Hình 2H).

Sự giảm synapsin I mRNA có vẻ đặc hiệu với hải mã vì không có thay đổi liên quan đến chế độ ăn HFS nào được quan sát ở vỏ não đại não (Hình 2E).

3.3. mRNA của GAP-43

Mức GAP-43 mRNA giảm đáng kể trong hải mã sau 2 và 6 tháng dùng chế độ ăn HFS (Hình 3A) và tương quan với mức BDNF mRNA ($r_{2\text{tháng}} = 0,82$, $P \leq 0,01$; $r_{6\text{tháng}} = 0,96$, $P \leq 0,01$). Sự giảm GAP-43 mRNA cũng tương quan với sự giảm synapsin I mRNA ($r_{2\text{tháng}} = 0,87$, $P \leq 0,01$; $r_{6\text{tháng}} = 0,98$, $P \leq 0,01$). Không phát hiện thay đổi nào về biểu hiện GAP-43 ở vỏ não đại não ở bất kỳ thời điểm nào được kiểm tra (Hình 3D).

3.4. mRNA và protein CREB

Mức CREB mRNA giảm trong hải mã (Hình 4A) nhưng không giảm ở vỏ não đại não (Hình 4E) của chuột ăn chế độ HFS trong 6 tháng hoặc 2 năm. Western blot cho thấy mức thấp hơn của phospho-CREB (Hình 4C) và CREB toàn phân (Hình 4G) ở nhóm HFS sau 6 tháng dùng chế độ ăn so với nhóm LFCC. Giá trị CREB (phosphoryl hóa, $r = 0,88$, $P \leq 0,01$; toàn phân, $r = 0,98$, $P \leq 0,01$) tương quan thuận với giá trị BDNF.

3.5. Học tập không gian ở chuột ăn chế độ HFS

Chuột duy trì chế độ ăn HFS trong 1 hoặc 2 tháng cần nhiều thời gian hơn so với chuột LFCC để tìm thấy nền tảng (Hình 5A). Sau 1 tháng dùng chế độ ăn, độ trễ thoát trung bình cho nhóm HFS dài hơn đáng kể so với chuột LFCC ($P \leq 0,05$). Sau 2 tháng dùng chế độ ăn, độ trễ thoát trung bình cho

nhóm HFS dài hơn so với chuột LFCC trong cả 3 ngày kiểm tra ($P \leq 0,05$). Những kết quả này tương quan đáng kể với mức BDNF hải mã giảm (Hình 6E, F).

Sau khi loại bỏ nên tảng vào cuối giai đoạn kiểm tra thứ hai, chuột ăn chế độ HFS bơi ngẫu nhiên qua bốn góc phân tư, không tìm thấy sự khác biệt đáng kể trong khoảng cách bơi giữa bốn góc phân tư (Hình 5C, phải), và chúng tôi tìm thấy mối tương quan cao giữa những kết quả này và mức BDNF (Hình 6G, H).

3.6. Học tập không gian ở chuột ăn chế độ ăn thông thường (LFCC)

Điểm số độ trễ thoát của mỗi con chuột được kiểm tra trong mê cung nước được so sánh với mức BDNF mRNA và protein sử dụng phân tích hồi quy tuyến tính (Hình 6). Kết quả cho thấy mối tương quan thuận sao cho những con chuột có độ trễ thoát dài hơn có mức BDNF mRNA và protein thấp hơn trong hải mã (Hình 6A, B). Chuột LFCC bơi chủ yếu trong góc phân tư nơi nền tảng được đặt ($45 \pm 1\%$, Hình 5C, trái). Những kết quả này tương quan cao với mức BDNF mRNA và protein (Hình 6C, D).

4. THẢO LUẬN

4.1. Chế độ ăn HFS làm giảm BDNF và hiệu suất học tập

Nghiên cứu hiện tại cung cấp bằng chứng mới về tác động của chế độ ăn lên tính mềm dẻo và chức năng thần kinh thông qua điều tiết BDNF, trong điều kiện không có các yếu tố nguy cơ khác liên quan đến rối loạn tim mạch. Hiệu suất học tập không gian liên quan đến mức BDNF hải mã, sao cho những con vật có mức BDNF cao hơn hoạt động tốt hơn.

Tiêu thụ chế độ ăn HFS đã giảm BDNF mRNA và protein tại thời điểm sớm nhất được kiểm tra (2 tháng: mRNA -24%; protein -39%) và dẫn đến sự giảm thêm khi tiếp tục dùng chế độ ăn (6 tháng: mRNA -26%; protein -67%; 2 năm: mRNA -42%). Mức BDNF giảm liên quan đến sự thiếu hụt trong học tập thông tin không gian và khả năng lưu giữ thông tin này.

4.2. Chế độ ăn và tác động của BDNF lên tính mềm dẻo thần kinh

Hình thành trí nhớ liên quan đến những thay đổi ngắn hạn về đặc tính điện và những thay đổi cấu trúc dài hạn của synapse. Mức phosphoryl hóa protein, protein toàn phân và mRNA của synapsin I giảm trong hải mã của chuột HFS. Có khả năng rằng chế độ ăn có thể gọi lên các phản ứng phối hợp của hệ thống BDNF và synapsin I, và/hoặc BDNF có thể ảnh hưởng đến synapsin I ở mức phiên mã và sau dịch mã.

GAP-43 đã được liên hệ đến những thay đổi hình thái synapse phụ thuộc vào đầu vào có thể liên quan đến học tập và trí nhớ. GAP-43 không giảm sau 2 năm dùng chế độ ăn HFS, điều này có thể liên quan đến cơ chế bù trừ. Chế độ ăn HFS cũng làm giảm mức CREB mRNA và protein CREB (phosphoryl hóa và toàn phân) và những sự giảm này tương quan thuận với mức BDNF.

Sự thiếu hụt trong học tập không gian sau 2 tháng dùng chế độ ăn HFS có vẻ xảy ra trong điều kiện không có thay đổi CREB mRNA. Những kết quả này dường như chỉ ra sự suy giảm dần dần đáp lại chế độ ăn HFS khi các hệ thống phân tử bổ sung như CREB tham gia theo thời gian.

4.3. Cơ chế chế độ ăn tác động lên tính mềm dẻo thần kinh

Mặc dù các thông số sinh lý khác có thể góp phần vào tác động của chế độ ăn HFS lên tính mềm dẻo thần kinh, chúng ta có thể loại trừ tăng huyết áp và xơ vữa động mạch là nguyên nhân chính, ít nhất trong năm đầu tiên. Chuột cái không phát triển tăng huyết áp cho đến sau 12 tháng dùng chế độ ăn HFS và không biểu hiện xơ vữa động mạch. Chúng ta cũng có thể loại trừ béo phì là yếu tố gây giảm hoạt động dẫn đến mức BDNF thấp trong 6 tháng đầu.

Thực tế là chế độ ăn HFS gây ra kháng insulin, dẫn đến mức insulin cao trong máu, gợi ý rằng tăng insulin huyết có thể là yếu tố trong thiết kế thực nghiệm của chúng tôi. Tuy nhiên, tác động giả định của insulin sẽ là bù trừ hoặc bảo vệ thần kinh. Sản xuất gốc tự do như superoxide có thể là một biến số cho tác động của chế độ ăn lên não.

BDNF có vai trò quan trọng trong chức năng synapse, tăng trưởng thần kinh và hành vi, và kết quả của chúng tôi cho thấy rằng một số chức năng trong số này có thể bị tổn hại sau khi tiêu thụ chế độ ăn HFS. Hải mã liên quan đến học tập kết hợp và là mục tiêu chính của các bệnh thoái hóa thần kinh dẫn đến suy giảm trí nhớ. Sự giảm BDNF từ chế độ ăn HFS có thể tước đoạt các tế bào thần kinh sự bảo vệ tự nhiên chống lại lão hóa, tổn thương hoặc bệnh tật.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi cảm ơn V.R. Edgerton và J. Twiss đã đưa ra những nhận xét quan trọng về bản thảo, và S. Vaynman đã hỗ trợ kiểm tra mô cung nước Morris. Nghiên cứu này được tài trợ bởi các giải thưởng NIH NS 38978 và NS 39522.

TÀI LIỆU THAM KHẢO (Chọn lọc)

- Baekelandt V. và cộng sự (1994). Thay đổi trong GAP-43 và synapsin cung cấp bằng chứng cho sự tái tổ chức synapse ở nhân thể gói ngoài bên lưng mào trưởng thành. *Eur. J. Neurosci.* 6, 754–765.
- Barnard R.J. và cộng sự (1993). Ảnh hưởng của chế độ ăn nhiều chất béo, sucrose lên insulin huyết thanh và các yếu tố nguy cơ xơ vữa động mạch ở chuột. *Atherosclerosis* 100, 229–236.
- Barnard R.J. và cộng sự (1998). Kháng insulin do chế độ ăn gây ra xuất hiện trước các khía cạnh khác của hội chứng chuyển hóa. *J. Appl. Physiol.* 84, 1311–1315.
- Finkbeiner S. (2000). Điều tiết canxi của gen yếu tố dinh dưỡng thần kinh từ não. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 394–401.
- Gómez-Pinilla F. và cộng sự (2001a). Học tập không gian gây ra thụ thể neurotrophin và synapsin I trong hải mã. *Brain Res.* 904, 13–19.
- Kalmijn S. và cộng sự (2000). Hội chứng tim mạch chuyển hóa và nguy cơ sa sút trí tuệ ở người già Mỹ gốc Nhật. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2255–2260.
- Kesslak J.P. và cộng sự (1998). Học tập điều chỉnh tăng BDNF mRNA: cơ chế tạo điều kiện mã hóa và duy trì mạch. *Behav. Neurosci.* 112, 1012–1019.
- Knopman D. và cộng sự (2001). Các yếu tố nguy cơ tim mạch và suy giảm nhận thức ở người trưởng thành trung niên. *Neurology* 56, 42–48.
- Linnarsson S. và cộng sự (1997). Thiếu hụt học tập ở chuột đột biến BDNF. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2581–2587.
- McAllister A.K. và cộng sự (1999). Neurotrophin và tính mềm dẻo synapse. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 295–318.
- Poo M.-m. (2001). Neurotrophin như là chất điều biến synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 24–32.
- Silva A.J. và cộng sự (1998). CREB và trí nhớ. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 127–148.
- Thoenen H. (1995). Neurotrophin và tính mềm dẻo thần kinh. *Science* 270, 593–598.