

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.11.008

胶质细胞对 A β 诱导的阿尔茨海默病大鼠脑神经损伤的影响*狄婷婷^{1,2}, 王秋杰³, 张 美⁴, 王瑞婷^{4 Δ}

(1. 承德医学院研究生 2012 级; 2. 承德护理职业学院; 3. 承德市医学情报站; 4. 承德医学院, 河北承德 067000)

[摘要] **目的** 探讨神经胶质细胞对 β -淀粉样蛋白(A β)诱导的阿尔茨海默病(AD)大鼠脑神经损伤的作用。**方法** 将雄性 Wistar 大鼠 20 只,分为对照组和模型组,每组 10 只;模型组双侧海马注射凝胶态 A β (10 μ g),对照组注射生理盐水;行水迷宫实验;硫堇染色观察皮层神经元形态变化及数量;酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平;免疫组化检测胶质细胞及神经胶质原纤维酸性蛋白质(GFAP)表达。**结果** 模型组大鼠水迷宫各项指标均明显低于对照组($P < 0.05$);皮层神经元数量较对照组明显减少($P < 0.01$);血清中 TNF- α 、IL-1 β 明显高于对照组($P < 0.05$);海马 GFAP 阳性细胞数明显多于对照组($P < 0.05$)。**结论** A β 可激活胶质细胞及促炎因子释放,引起大鼠脑神经元损伤,导致大鼠学习、记忆能力降低。

[关键词] 阿尔茨海默病;淀粉样蛋白;胶质细胞;炎症反应;神经胶质原纤维酸性蛋白质**[中图分类号]** R363.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)11-1466-03Effect of glial cell on neuron damage induced by A β in Alzheimer's disease rat*Di Tingting^{1,2}, Wang Qiujie³, Zhang Mei⁴, Wang Ruiting^{4 Δ}

(1. Postgraduate Grade 2012, Chengde Medical University; 2. Chengde Nursing Vocational College; 3. Chengde Municipal Medical Information Station; 4. Chengde Medical University, Chengde, Hebei 067000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of glial cells on cerebral neuron damage induced by amyloid beta protein(A β) in Alzheimer's disease rat. **Methods** 20 male Wistar rats were randomly divided into the control group and the model group, 10 cases in each group. The gel state A β (10 μ g) was injected into the rat's bilateral hippocampus in the model group, while the control group was injected with normal saline; the Morris water maze test was performed to assess the rat's learning and memory ability; the thionine stain was used for observing the morphology and quantity of cerebral cortex neurons; the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was adopted to detect the serum tumor necrosis factor alpha(TNF- α) and interleukin 1 beta(IL-1 β) levels; the immunohistochemical was used to detect the expression of glial cell and glial fibrillary acidic protein (GFAP). **Results** The various indexes in the model group were significantly lower than those in the control group($P < 0.05$); the quantity of cerebral cortex neurons in the model group was significantly decreased compared with that in the control group($P < 0.01$); the ELISA results showed that the levels of TNF- α and IL-1 β in the model group were significantly higher than those in the control group($P < 0.05$); the immunohistochemistry showed that the number of GFAP positive cells in the hippocampus in the model group was significantly more than that in the control group($P < 0.05$). **Conclusion** A β might activate the glial cells and promote the release of inflammatory cytokines, which causes the damage of rat cerebral neurons and leads to decrease the rat's learning and memory ability.

[Key words] Alzheimer disease; amyloid; glial cells; inflammation; glial fibrillary acidic protein

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一种以认知功能障碍及记忆减退或缺失为主要特征的退行性病变^[1]。其发病机制复杂, β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)作为 AD 发病的始动因子现已得到公认^[2]。AD 患者脑内持续存在慢性炎症反应,参与炎症反应的细胞主要是神经胶质细胞^[3-5]。有研究认为,长期使用非甾体类抗炎药可使 AD 的发病率降低^[6],支持炎症反应参与了 AD 的发病。本实验采用大鼠双侧海马注射 A β 的方法制作痴呆模型,观察 A β 诱导的大鼠神经元损伤及神经胶质细胞的变化,探讨神经胶质细胞在 A β 引起神经元损伤中的作用,为寻找 AD 治疗新的靶点提供实验依据。

1 材料与方

1.1 材料 实验动物:选择雄性 Wistar 大鼠 20 只,10~12

周,体质量(280 \pm 20)g,SPF 级,购自北京华阜康生物技术科技有限公司(动物合格证号为 0289310)。实验试剂:A β_{25-35} 购自 Sigma 公司,高效液相色谱法(HPLC)检测纯度大于或等于 97%,A β_{25-35} 1 mg 干粉溶于 500 μ L 无菌生理盐水(2 g/L),-20 $^{\circ}$ C 保存,临用前置于 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 3~5 d 成凝胶态。大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)(RRA00),白细胞介素-1 β (IL-1 β)(RTA00)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒由 R&D 研发中心提供,通用型 SP 工作液 SP-9000 免疫组化试剂盒、山羊抗兔神经胶质原纤维酸性蛋白质(GFAP)多抗(G9269)、山羊抗兔 IgG/辣根过氧化物酶标记(ZB2301, Lot:73399)购自北京中杉金桥生物技术有限公司,其他试剂为分析纯。

1.2 方法

* 基金项目:河北省高校省级重点学科资助项目(20130337);河北省教育厅重点资助课题(ZD20131051)。 作者简介:狄婷婷(1981-),讲师,硕士研究生,主要从事阿尔茨海默病发病机制研究。 Δ 通讯作者, Tel:(0314)2290069; E-mail:wrtwrt8324@sina.com。

1.2.1 实验动物分组及处理 将 20 只大鼠分为模型组和对照组,每组 10 只。分笼饲养,自然光照,自由食水,标准饲料。适应性饲养 7 d 后,模型组大鼠双侧海马各注射 5 μ L 凝胶态 A β_{25-35} (10 μ g),对照组大鼠双侧海马各注射 5 μ L 0.9% 生理盐水溶液。14 d 后行 Morris 水迷宫行为学实验,21 d 后将大鼠全部处死,心脏取血,大鼠脑组织固定,石蜡包埋。

1.2.2 动物痴呆模型制作 大鼠腹腔注射 4% 的水合氯醛溶液 (1 mL/100 g) 麻醉后,固定于脑立体定位仪上,参照大鼠脑立体定位图谱,定位海马 (hippocampus) CA1 区,按预试验确定进针点进针:前囟后 (anteroposterior, AP) 3.50 mm,中缝左或右 (mediolateral, ML) \pm 2.00 mm,颅骨硬脑膜平面向下 (dorsoventral, DV) 2.70 mm,微量注射器向双侧海马缓慢注入 A β_{25-35} ,留针 5 min,缓慢拔针,缝合伤口,术后给予青霉素 10 万 U/只,每天 1 次,共 3 d。

1.2.3 Morris 水迷宫行为学实验 取高为 60 cm 的圆形不锈钢水池,直径为 120 cm,将该水池等分为 4 个象限,在目标象限的正中间放置一个高为 23.50 cm,直径为 10.00 cm 的圆形平台,水温为 (21 \pm 1) $^{\circ}$ C;实验期间迷宫周围参照物不变,迷宫上方安置摄像机,同步记录大鼠运动轨迹。实验前需让大鼠自由游泳 2 min 后,每天将大鼠从池壁 4 个象限点面向池壁放入水中,测验 2 次,6 d 后撤去平台,观察大鼠在 2 min 内通过平台区的次数,并记录大鼠在平台象限内停留的时间及所游路程等数据。

1.2.4 血清制备及指标检测 取 Wistar 大鼠,每组 10 只,水合氯醛麻醉后,心脏取血,室温下放置 30 min,于 4 $^{\circ}$ C,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,冻存于低温冰箱。应用 ELISA 检测大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平,严格按照试剂盒说明书操作。

1.2.5 灌注取材 取血后,大鼠左心室快速灌注生理盐水 250 mL,然后灌注含 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液 (PBS-T) 250 mL,先快后慢,1 h 后断头取脑,左右半球各在海马注射部位沿冠状面切开,4% 多聚甲醛固定过夜,经脱水、透明、浸蜡,将两块组织的切面朝下包埋,行冠状切片,片厚 5 μ m,以备用于染色和免疫组化。

1.2.6 硫堇尼氏体染色法 从石蜡标本连续切片中每间隔 4 张抽取一张,经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水合,蒸馏水冲洗,0.2% 硫堇 60 $^{\circ}$ C 水浴 30~60 min,冷却后梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.7 细胞计数法 每组选取 3 只大鼠,每个标本选取大鼠大脑皮层细胞损伤严重段 2 张切片,光镜下观察,每张随机抽取大鼠大脑皮层切片的 2 个 400 倍视野,进行神经细胞计数。

1.2.8 免疫组织化学技术检测胶质细胞及 GFAP 表达 石蜡切片,经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水合,蒸馏水冲洗,PBS 清洗 3 次;3% 甲醇-H $_2$ O $_2$ 去除过氧化物酶;95 $^{\circ}$ C 水浴抗原修复 10~15 min,冷却后 PBS 清洗;10% 山羊血清封闭,37 $^{\circ}$ C 15 min;滴加 GFAP I 抗 (1:80),4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 洗;滴加 II 抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,PBS 洗;滴加亲和素-生物素-过氧化物酶 (ABC) 复合物,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,PBS 洗;二氨基联苯胺 (DAB) 辣根过氧化物酶显色;终止显色;苏木素复染;脱水,透明,封片,用 PBS 液代替 I 抗作为阴性对照。GFAP 是胶质细胞特异性分泌的一种酸性蛋白,切片中见到胶质细胞突起呈棕黄色为 GFAP 蛋白表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计

量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

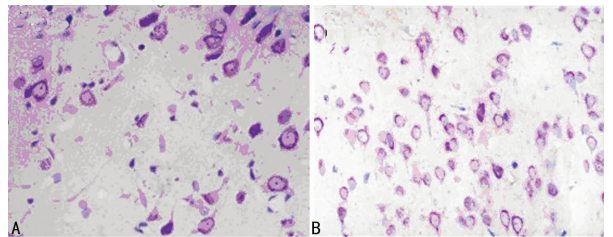
2.1 两组大鼠水迷宫实验结果比较 水迷宫实验 6 d 两组大鼠各项指标比较,结果显示,对照组的大鼠 2 min 内穿越平台区域的次数、在平台象限停留的时间、在平台象限所游路程与总路程比值,均明显高于模型组 ($P<0.05$),见表 1。

表 1 水迷宫实验 6 d 两组大鼠各项指标比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	穿越平台数(次)	平台停留时间(s)	所游路程比值(%)
对照组	13.01 \pm 2.41	59.06 \pm 8.67	62.20 \pm 7.70
模型组	5.20 \pm 1.68 ^a	36.52 \pm 4.25 ^a	41.60 \pm 4.30 ^a

^a: $P<0.05$,与对照组比较。

2.2 A β 对大鼠皮层神经元的影响 硫堇尼氏体染色,对照组大鼠皮层神经元较多,神经元形态清晰、完整,核仁清晰,突起明显,胶质细胞少;模型组大鼠皮层神经元少,突起减少、断裂,细胞体不完整,局部区域神经元死亡 (图 1),胶质细胞增多,可见胶质细胞吞噬神经元现象。模型组皮层神经元 (105.80 \pm 15.61) 个明显少于对照组 (516.19 \pm 65.32) 个,两组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。



A: 模型组; B: 对照组。

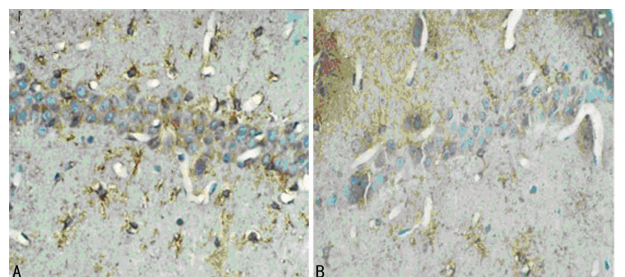
图 1 硫堇尼氏体染色大鼠皮层 ($\times 400$)

2.3 两组大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平比较 模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 水平明显高于对照组,两组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2。

表 2 两组大鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{pg/mL}$)

组别	TNF- α	IL-1 β
对照组	40.05 \pm 13.18	7.56 \pm 2.87
模型组	85.62 \pm 25.26 ^a	13.32 \pm 7.16 ^a

^a: $P<0.05$,与对照组比较。



A: 模型组; B: 对照组。

图 2 两组大鼠海马 CA1 区 GFAP 表达 ($\times 400$)

2.4 两组大鼠海马 GFAP 表达结果比较 镜下见模型组海马胶质细胞 GFAP 蛋白阳性表达明显强于对照组,同时模型

组的胶质细胞数量(17.50±8.62)个明显高于对照组(8.21±6.10)个,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。两组大鼠海马 GFAP 表达,见图 2。

3 讨 论

体外凝聚状态的 A β 与 AD 患者脑内的 A β 结构相似,有研究表明 A β_{25-35} 能引起神经元损伤、学习、记忆能力下降^[7-8]。本实验大鼠双侧海马注射凝胶态 A β_{25-35} ,发现模型组大鼠皮层神经元损伤、学习记忆能力降低,与文献^[9-10]的研究结果一致。有研究报道,AD 患者脑内变性的神经元周围有大量胶质细胞增生^[11],GFAP 在激活的胶质细胞中表达增加,其表达与胶质细胞活性成正比,表达增强标志中枢神经系统损害时反应性胶质细胞增生^[12-14]。本实验发现,模型组大鼠皮层局部区域神经元死亡,胶质细胞明显增多,可见胶质细胞吞噬神经元现象。模型组 GFAP 蛋白阳性表达明显强于对照组,提示 A β 激活了胶质细胞,胶质细胞参与了 A β 引起的神经元损伤。

AD 是老年人常见的一种多因异质性疾病,其病理表现多样,涉及多种病理机制。其中老年斑形成是 AD 最具特征性的病理改变,有研究显示,AD 患者脑内老年斑周围存在大量活化的神经胶质细胞和炎性因子,考虑 AD 患者脑内持续存在慢性炎症反应^[3-5],这种炎症反应可能是导致机体神经退行性病变的主要因素之一。宴燕等^[15]研究发现 AD 患者血清 TNF- α 、IL-1 β 水平显著高于正常对照组,有研究报道,活化的胶质细胞可释放炎症因子,引起神经元损伤,本研究发现模型组大鼠血中 TNF- α 、IL-1 β 水平明显高于对照组^[16-17]。Takeuchi 等^[18]研究发现 TNF- α 诱导神经毒性是通过激活的胶质细胞自分泌谷氨酰胺实现的,TNF- α 、IL-1 β 一定程度上可反映痴呆严重程度,可能成为临床辅助诊断的生物学指标,高水平的 TNF- α 不仅对神经元具有毒性作用,并且可协同 IL-1 强烈诱导 IL-6 产生,加速病程的发展^[19]。

综合本实验神经元损伤、GFAP 表达和 TNF- α 、IL-1 β 水平,证实 A β 激活胶质细胞,导致炎症因子释放,损伤神经元。慢性激活状态的胶质细胞所产生的细胞因子在 AD 发病的不同环节可能起放大炎症过程和细胞毒性作用。因此,AD 患者通过抗炎药物抑制脑内炎症反应,可能延缓病程的发展。

参考文献

- [1] 王维治. 神经病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:249.
- [2] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. Science, 2002, 297(5580): 353-356.
- [3] 庄丽英, 张志珺. 神经炎症与阿尔茨海默病[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2012, 21(7): 664-665.
- [4] 朱飞奇, 钱采韵. 神经炎症与阿尔茨海默病的迷茫与前景[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2009, 35(1): 50-52.
- [5] 官杰, 李浩, 刘剑刚, 等. 炎症反应及抗炎药物与阿尔茨海默病的研究进展[J]. 中华神经医学杂志, 2012, 11(12): 1282-1285.
- [6] Conti P, Varvara G, Murmura G, et al. Comparison of

beneficial actions of non-steroidal anti-inflammatory drugs to flavonoids[J]. Biol Regul Homeost Agents, 2013, 27(1): 1-7.

- [7] Berson A, Knobloch M, Hanan M, et al. Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology[J]. Brain, 2008, 131(1): 109-119.
- [8] Pan YF, Chen XR, Wu MN, et al. Arginine vasopressin prevents against amyloid beta(25-35) induced impairment of spatial learning and memory in rats[J]. Horm Behav, 2010, 57(4/5): 448-454.
- [9] 张晓红, 余焕玲, 肖荣, 等. β 淀粉样肽 31-35 和 25-35 对培养大鼠皮质神经元的毒性作用[J]. 中华预防医学杂志, 2009, 43(12): 1081-1085.
- [10] 汪保华, 袁华, 吕志华, 等. 灵芝多糖对模拟 AD 学习记忆障碍大鼠海马白细胞介素-6 表达的影响[J]. 卒中与神经疾病, 2007, 14(4): 206-213.
- [11] 周晓辉, 程新春. 炎性细胞因子在 Alzheimer 病发病中的作用[J]. 临床神经病学杂志, 2007, 20(5): 397-398.
- [12] Kuegler PB, Baumann BA, Zimmer B, et al. GFAP-independent inflammatory competence and trophic functions of astrocytes generated from murine embryonic stem cells[J]. Glia, 2012, 60(2): 218-228.
- [13] Luna G, Lewis GP, Banna CD, et al. Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Müller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin[J]. Mol Vision, 2010, 16(269): 2511-2523.
- [14] 熊鹏, 吴秋霞, 王继才, 等. 精神分裂症患者血清 GFAP 与 MBP 水平的变化[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2013, 39(1): 44-47.
- [15] 宴燕, 王萍. 阿尔茨海默病血浆中 IL-6、A β 1-40、MCSF、IL-1 β 、TNF- α 的临床诊断意义[J]. 中国当代医药, 2012, 19(34): 17-18.
- [16] Block ML, Hong JS. Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity[J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(5): 1127-1132.
- [17] Lee CY, Tse W, Smith JD. Apolipoprotein E promotes A β trafficking and degradation by modulating microglial cholesterol levels[J]. Biol Chem, 2012, 287(3): 2032-2044.
- [18] Takeuchi H, Jin S, Wang J, et al. Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner[J]. J Biol Chem, 2006, 281(30): 21362-21368.
- [19] 邹烈铭, 朱文芳, 裴瑜, 等. 老年性痴呆患者认知功能与血清炎性细胞因子浓度的相关研究[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2012, 6(11): 2970-2973.