文章编号:1000-5404(2009)21-2131-03

论著

β-淀粉样蛋白脑室注射对大鼠海马星型胶质细胞活化和细胞增殖的作用

高长越,王延江,方传勤,许志强,邓 娟,周华东 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

摘 要:目的 通过观察大鼠侧脑室注射β-淀粉蛋白(β-amyloid peptide, Aβ)后海马胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的表达,探讨Aβ对海马局部星型胶质细胞活化增生的作用及对海马神经发生的可能影响。**方法** 40只SD大鼠分为对照组($n=10$)和实验组($n=30$),将Aβ1-42注射入大鼠侧脑室,分别于术后3、7、14、30 d处死动物,应用免疫组化方法观察GFAP的表达,并用免疫荧光双标标记BrdU、GFAP以判断增殖细胞的种类。**结果** 实验组大鼠海马GFAP阳性细胞明显增加,到7 d达到高峰,14 d后逐渐下降,较对照组差异显著($P<0.01$),实验组各时相点BrdU、GFAP双标结果显示有部分BrdU阳性细胞GFAP为阳性,对照组双标阳性细胞很少。**结论** β-淀粉蛋白脑室注射后大鼠海马星型胶质细胞活化增生,部分增生的星型胶质细胞可能来源于神经干细胞。

关键词: β-淀粉样蛋白;海马;星型胶质细胞;AD
中图法分类号: R322.81; R329.28; R341 **文献标识码:** A

Intracerebroventricular injection of β-amyloid peptide improves astrocyte activation and proliferation in rat hippocampus

GAO Chang-yue, WANG Yan-jiang, FANG Chuan-qin, XU Zhi-qiang, DENG Juan, ZHOU Hua-dong (Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To evaluated the effect of unilateral intracerebroventricular injection (i.c.v.) of β-amyloid peptide (Aβ) on astrocyte activation and neurogenesis by observing the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the hippocampus around the injecting area. **Methods** Total 40 adult male SD rats were randomly divided into control group ($n=10$, 2 for each time points) and experimental group ($n=30$, 6 for each time points). Aβ1-42 (7 μg) or normal saline (7 μl) was injected into the lateral cerebroventricle of corresponding animals and then sacrificed at 3, 7, 14 and 30 d after infusion. The expression of GFAP was observed by immunohistochemical staining. The double labeling of BrdU and GFAP was observed by immunofluorescence methods to identify the proliferative cells. **Results** The number of GFAP positive cells in the experimental group was increased significantly after the injection and reached maximum on the 7th day, and then decreased slowly after 14 d after the injection when compared with control ($P<0.01$). Some of BrdU positive cells were GFAP positive in the experimental group, while there were few double positive cells in the control group. **Conclusion** Astrocytes are activated after i.c.v. injection of Aβ, and some of them come from the neural stem cells (NSCs) in the hippocampus. Aβ may be one of the factors promoting NSCs to develop into astrocytes.

Key words: β-amyloid peptide; hippocampus; astrocyte; Alzheimer disease

阿尔茨海默病(alzheimer disease,AD)的临床特征为进行性的痴呆和β-淀粉蛋白(β-amyloid peptide,Aβ)在脑内病理性沉积,后者目前被认为是AD发病的中心环节[1]。海马是AD最易受累脑区,而海马齿状回下颗粒层(subgranular zone,SGZ)是成年神经发生的区域之一,与学习记忆密切相关[2]。侧脑室注射Aβ可以造成大鼠AD样行为学改变[3],并可减少海马注射局部损伤所带来的干扰。为了解Aβ对海马区星型胶质细胞活动变化以及该区神经发生的影响,本实验采用Aβ脑室注射致AD大鼠模型,观察注射后海马胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的表达变化,免疫荧光双标判断部分活化的星型胶质细胞来源,以探讨Aβ在AD发病机制中的作用。

基金项目: 重庆市自然科学基金(CSTC2005BB5276)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2005 BB5276)
作者简介: 高长越,男,江苏省铜山县人,博士,主治医师,讲师,主要从事脑血管病及老年期痴呆方面的研究。电话:(023)68757850, E-mail: gaocy128@yahoo.com.cn
通信作者: 周华东,电话:(023)68757851,E-mail: zhouhuad@163.com
收稿日期: 2009-03-19;**修回日期:** 2009-06-08

1 材料与方法

1.1 材料

健康 SD 雄性大鼠 40 只,体质量 240 ~ 280 g ,由第三军医大学实验动物中心提供。Aβ1-42(Anaspec 公司),兔 GFAP 一抗、抗 BrdU 一抗(Sigma 公司),S-P 复合物、羊抗兔 IgG、FITC 标记山羊抗兔 IgG、SABC-Cy3 荧光试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供。BrdU(Sigma 公司)溶于无菌生理盐水(用 0.007 mol/L NaOH 配制)中,终浓度 100 mg/ml。

1.2 分组及处理措施

将动物按抛硬币法分为对照组和实验组,实验组再分为 5 个时间点,即注射后 3、7、14、21、30 d,每一时间点各 6 只。对照组相应时间每组 2 只。对照组及实验组大鼠处死前 1 d 进行腹腔注射 BrdU,每次剂量为 100 mg/kg,共注射 2 次,间隔 12 h,最后 1 次 BrdU 注射后 24 h 处死动物。实验组和对照组大鼠均经 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后固定于江湾Ⅰ型立体定向仪上。按 Paxinos 和 Watson 立体定位图谱,以前囟为零点,在前囟后 0.8 mm、中线旁开 1.1 mm 和 3.6 mm 深度用微量进样器将 7 μg Aβ1-42 或 7 μl 灭菌生理盐水分别注入实验组或对照组动物右侧脑室,连续 3 d,分别于最后 1 次注射后 3、7、14、21、30 d 灌注、取材、冰冻切片,片厚 35 μm,每个标本取海马相同部位 5 张切片计数。

1.3 免疫组化及免疫荧光双标

在 Aβ 注射后 3、7、14、30 d 以及对照组大鼠脑切片行 GFAP 免疫组化检测,研究海马胶质细胞增生情况。切片用 0.01 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗 10 min × 3 次,4% PFA 固定 10 min,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次,5% 山羊血清封闭 30 min 后加第一抗体,37 ℃孵育2 h。加第二抗体,37 ℃孵育 2 h。0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min × 3 次,加 S-P 复合物,37 ℃孵育 30 min。0.01 mol/L PBS 漂洗 10 min × 3 次,加 0.05% DAB 显色 5 min,常规脱水,透明,DPX 封片。

新鲜配置 3% H_2O_2,室温浸泡 5 ~ 10 min 以灭活内源性酶;4% 布安液(4% 甲醛/1% 苦味酸/5% 醋酸)固定 15 min;2 mol/L HCl 浸泡 1 h;0.1 mol/L 硼酸缓冲液中和 2 min × 3 次,PBS 洗涤 10 min × 3 次,加封闭用血清,室温,30 min。滴加兔 GFAP 一抗(1∶1 000,Sigma 公司)、抗 BrdU 一抗(1∶5 000),恒温下(37 ℃)孵育 2 h,PBS 冲洗;滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG 室温下 30 min,滴加试剂 SABC-Cy3,室温 30 min 后,滴加第二种一抗(GFAP、BrdU),37 ℃,1 ~ 2 h。滴加 FITC 标记山羊抗兔 IgG,37 ℃,1 ~ 2 h。50% 甘油封片,立即荧光显微镜显色照相。

1.4 图像分析

切片在统一放大倍数(10 × 20)下,累计每组海马阳性细胞总数后取平均阳性细胞数。

1.5 统计学分析

数据用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理,所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 t 检验。

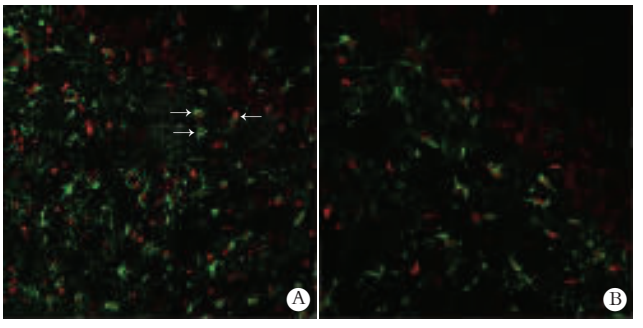
2 结果

2.1 海马齿状回 GFAP 阳性细胞变化

对照组大鼠海马齿状回、CA1、CA3、CA4 区均有少量 GFAP 阳性星形胶质细胞。Aβ 侧脑室注射后,发现大鼠海马齿状回、CA1、CA3、CA4 区星形胶质细胞均明显增多,7 d 达到顶峰,21 d 后稍下降,在实验期内均高于正常水平;实验组海马 3、7、14、30 d,GFAP 阳性细胞数[(78.04 ± 8.57)、(192.09 ± 10.31)、(178.16 ± 9.06)、(166.05 ± 8.99)]均明显大于对照组($P < 0.01$,图 1)。

2.2 Aβ 脑室注射后海马齿状回 BrdU 与 GFAP 共存情况

经 BrdU、GFAP 免疫荧光双标检测发现术后各时相点均有有部分 BrdU 阳性细胞 GFAP 标记为阳性,14 d 时最为明显,对照组仅有极少量双标阳性细胞(图 2)。

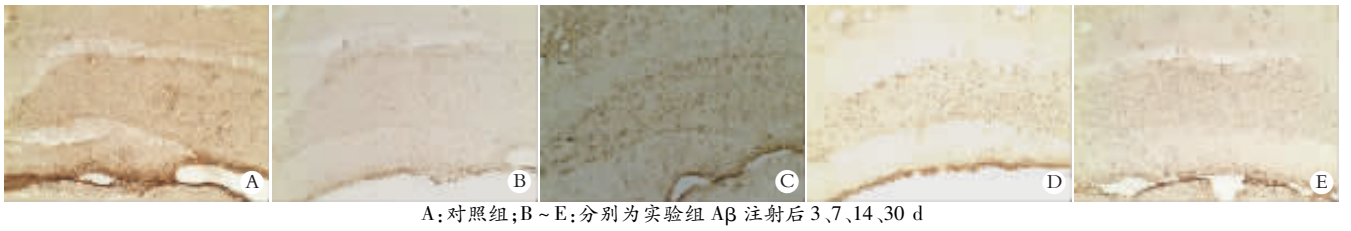


A:实验组;B:对照组 BrdU 为绿色,GFAP 为红色,↑:共存阳性细胞

图 2 Aβ 脑室注射 14 d 后海马齿状回 GFAP、BrdU 免疫荧光双标观察 (×400)

3 讨论

海马齿状回下颗粒层是成年神经干细胞存在的区域之一,该区神经干细胞向成熟神经元发生分化被认为与学习记忆密切相关[2],而局部微环境则对神经发生起着重要的调节作用;AD 突出临床表现为认知功能下降、学习记忆能力衰退,发病的中心环节是 β-淀粉蛋白在脑内沉积(其中 Aβ1-42 为主要聚集物,毒性作用最强)。因此 Aβ 堆积对局部微环境带来哪些变化、又会对海马神经发生有何影响,是目前的研究热点



A:对照组;B ~ E:分别为实验组 Aβ 注射后 3、7、14、30 d

图 1 免疫组化观察 Aβ 侧脑室注射后各时相点海马 GFAP 阳性表达 (S-P × 200)

之一。有关 Aβ 在神经发生中的作用尚存在争论。Haughey 等[4]的研究显示,淀粉样蛋白干扰成年小鼠室下区/大脑皮层的神经发生以及离体研究下的皮层神经干细胞的神经发生。而 Sotthibundhu 等[5]发现 Aβ1-42 早期可促进成年鼠室管膜下区的神经发生。最近研究表明如果脑内星型胶质细胞不被激活,那么植入鼠脑的干细胞能够产生更多、更成熟的神经细胞[6]。为此,本实验采取了侧脑室注射 β-淀粉样蛋白致大鼠 AD 模型,研究 Aβ 对海马区星型胶质细胞活动变化以及对该区神经发生的影响。

GFAP 是星形胶质细胞内 8 ~ 9 nm 中间丝蛋白,神经系统受到刺激或损伤后,星形细胞表现快速反应,其标志之一是 GFAP 的表达,因此目前将 GFAP 的表达与否作为星形细胞活动状态的标志。非放射性标记物 5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)为胸腺嘧啶的衍生物,掺入 S 期细胞的机制同^{3}H-TdR ,能与内源性胸腺嘧啶竞争掺入新合成的 DNA。活体注射或细胞培养加入,而后利用抗 BrdU 单克隆抗体,ICC 染色,显示增殖细胞,若同时结合其它细胞标记物,双重染色,可判断增殖细胞的种类[7]。本实验免疫组化结果显示,Aβ 注射后 GFAP 表达明显增加,在 14 d 达到最高,以后有所下降,但仍维持在较高水平。免疫荧光双标结果显示,部分 GFAP 阳性细胞 BrdU 标记亦为阳性,对照组 BrdU 阳性细胞极少有 GFAP 阳性。上述结果表明,Aβ 侧脑室注射后,静止期星形胶质细胞转化为反应性胶质细胞,代表了胶质细胞对脑损伤的反应,而部分活化的胶质细胞则可能来源于神经干细胞。AD 患病后 Aβ 堆积无疑会造成海马局部微环境发生变化,会对该区神经发生产生重要影响,根据本研究结果我们推测 Aβ 可能是促进神经干细胞向胶质细胞分化的因素之一,但具体机制尚有待研究加以阐明。

参考文献:

[1] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. Science, 2002, 297(5880): 353 - 356.

[2] Lie D C, Song H, Colamarino S A, *et al*. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004, 44(2): 399 - 421.

[3] 佾剑非,陈　红,任常山,等. β-淀粉蛋白脑室内注射建立阿尔茨海默病大鼠模型[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2005, 31(2): 145 - 147.

[4] Haughey N J, Nath A, Chan S L, *et al*. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease[J]. J Neurochem, 2002, 83(6): 1509 - 1524.

[5] Sotthibundhu A, Li Q X, Thangnipon W, *et al*. Abeta(1-42) stimulates adult SVZ neurogenesis through the p75 neurotrophin receptor[J]. Neurobiol Aging, 2008 Mar 26. [Epub ahead of print].

[6] Donovan M H, Yazdani U, Norris R D, *et al*. Decreased adult hippocampal neurogenesis in PDAPP mouse model of Alzheimer's disease[J]. J Comp Neurol, 2006, 495(1): 70 - 83.

[7] Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation[J]. Brain Res Rev, 2007, 53(1): 198 - 214.

(编辑　张　维)

2009 年我校国家自然科学基金工作再创佳绩

近日,国家自然科学基金委员会公布了 2009 年度项目集中受理期申报项目评审结果,据国科金计[2009]70 号通知,我校共中标各类基金项目 178 项,获批经费 5 362 万元,中标数量较 2008 年 136 项提高了 30.9%,获批经费较 2008 年 3 915 万提高了 37.0%,两项指标继 2008 年取得突破后,再创我校历史新高,在全国医学高校排名中继续名列前茅,这标志着我校基础研究水平和质量继续稳步提升。大坪医院心内科曾春雨教授获得国家杰出青年科学基金项目资助;基础医学部全军免疫学研究所吴玉章教授和西南医院病理学研究所卞修武教授获基金重点项目资助;西南医院全军眼科中心阴正勤教授获重大国际合作项目资助;西南医院检验科府伟灵教授获仪器专项项目资助;大坪医院陈海斌教授获海外合作项目资助。

(科研部计划处　供稿)