基础研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0052-03

电刺激小脑顶核对老年痴呆大鼠海马胶质纤维酸蛋白的表达影响

罗 晶,王永红

(重庆医科大学附属第一医院神经内科 重庆市神经病学高校重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究Aβ$_{1-40}$诱导阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)大鼠空间学习记忆能力及海马区星形胶质细胞(Astrocyte,AS)胶质纤维酸蛋白(Glial fibrillary acidic protein,GFAP)表达及电刺激小脑顶核(Fastigial nucleus stimulation,FNS)的干预作用。方法:将Aβ$_{1-40}$微量注射至大鼠右侧海马,制作AD大鼠模型,干预组给予电刺激小脑顶核和电刺激齿状核(Dentate nucleus stimulation,DNS),28d后进行水迷宫试验。免疫组织化学法检测GFAP免疫阳性细胞表达。结果:FNS干预后AD大鼠空间学习记忆能力明显改善($P<0.05$)。与假手术组相比,AD组、DNS组大鼠脑组织海马区可见星形胶质细胞GFAP表达明显增多($P<0.05$),FNS组大鼠脑组织海马区星形胶质细胞GFAP表达较AD组下降($P<0.05$)。结论:FNS可部分改善Aβ$_{1-40}$诱导的AD模型大鼠空间学习记忆障碍,其机制可能与降低GFAP的表达和抑制AS活性有关。

【关键词】淀粉样β蛋白;星形胶质细胞;胶质纤维酸蛋白

【中国图书分类法分类号】R741 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

Effect of fastigial nucleus stimulation on GFAP expression in hippocampus with Alzheimer disease in rats

LUO Jing,et al

(Department of Neurology,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*:Observe the effects of fastigial nucleus stimulation(FNS) on spatial memory and learning ability of the Aβ$_{1-40}$ induced Alzheimer rat model,by detecting GFAP expression of hippocampus area. *Methods*:Aβ$_{1-40}$ was microinjected into the right hippocampus of rats. Cerebella dentate nucleus and fastigial nucleus were stimulated separately before the model was made in interference group. The spatial memory and learning ability of the rat was evaluated by the Morris water maze procedure at the 28th days after injection. The expression of GFAP in astrocyte cell was determined with immunohistochemistry method. *Results*:The AD rats received FNS showed significant shorter escape latency than the group without FNS($P<0.05$).Aβ$_{1-40}$ could increase the optical density of positive cells of GFAP ($P<0.05$),FNS could reduce the optical density of positive cells of GFAP ($P<0.05$),but in dentate nucleus stimulation group no such effect was found. *Conclusion*:FNS can partly improve the spatial learning and memory dysfunction of AD rat by inhibits the expression of GFAP of hippocampus area and decrease the activity of astrocyte cell.

【Key words】 Amyloid beta-protein;Astrocyte;Glial fibrillary acidic protein

AD是一类病因未明的神经系统变性疾病,它以老年斑、神经元纤维缠结和突触丢失为主要病理改变。在AD患者脑组织中观察到某些脑区神经细胞广泛丢失及AS弥漫增生,且大多数AS位于损害的周围[1]。在AD发病机制中,异常的Aβ的聚集是形成AD病理改变的关键。传统观点认为:异常Aβ的聚集激活AS,AS激活促进Aβ沉积,形成恶性循环,促进AD病理改变发生。但Jacobsen等研究发现[2],小于18月龄的TG(Tg2576-transgenic mouse)转基因AD鼠脑中Aβ总量无明显增加,但AS确处于激活状态—表现为GFAP表达显著增强且出现胞体增大改变。本研究用免疫组织化学方法显示和观察FNS对AD大鼠海马区星形胶质细胞的形态影响,为探讨其治疗机制提供实验依据。

作者介绍:罗 晶(1983-),女,硕士,

研究方向:老年痴呆

通讯作者:王永红,女,教授,E-mail:wyh0231029@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1实验动物 健康雄性SD大鼠40只,月龄3个月,体重230~250g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2主要试剂 $A\beta_{1-40}$(美国Sigma公司),一抗为GFAP,稀释度为1:100,二抗为生物素标记的羊抗兔IgG,二抗SABC免疫组化染色试剂盒(均购于武汉博士德生物工程有限公司),DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1分组 40只SD雄性大鼠随机分为4组,每组10只,即$A\beta_{1-40}$微量注射组(AD组)、$A\beta_{1-40}$微量注射组+预电刺激小脑顶核组(FNS组)、$A\beta_{1-40}$微量注射组+预电刺激齿状核组(DNS组)和假手术组(SC组),FNS组予电刺激器刺激左侧小脑顶核,DNS组予电刺激器刺激左侧齿状核。

1.2.2Aβ的孵育 用无菌生理盐水将$A\beta_{1-40}$稀释成10μg/μl,37℃下孵育1周,使其变为聚集态Aβ。

1.2.3动物模型的制作 SD大鼠麻醉后固定于脑立体定向仪上,钻开颅骨,切开硬脑膜,按George Paxinos等[9]1998年版《大鼠脑立体定位图谱》,于前囟后3.0mm,中线右侧2.0mm处用微量注射器自脑表面垂直进针26mm,然后将1μl$A\beta_{1-40}$(10μg/μl)缓慢注入大鼠右侧海马。假手术对照组切开硬脑膜后即缝合伤口,并在大致相应位置取材和切片。FNS治疗组造模前2d分别给予FNS 1次(各1h),DNS治疗组造模前2d分别给予DNS 1次(各1h),齿状核定位:前囟后11.6mm,左旁开3.0mm,深度6.5mm;小脑顶核定位:前囟后11.6mm,左旁开1.1mm,深度5.6mm。电刺激为双极同心圆电极(100μm),强度50μA,频率70Hz,时程0.5ms,刺激时间1h。

1.2.4行为学测试 造模后28d,采用Morris水迷宫法测定大鼠空间学习记忆能力,平台设于C象限,水平面高于平台1.5cm,水温控制在22~24℃,各组大鼠连续测试5d,记录120s内大鼠从入水到爬上平台所需时间即逃避潜伏期时间。训练中,若大鼠120s内找到平台,让其在平台上停留10s;若未找到平台,用木棒将其引上平台并让其停留10s,潜伏期记为120s。

1.2.5免疫组化检测 水迷宫试验结束后灌注取脑做成蜡块,每只动物连续取带针道的切片10张,片厚5μm。按SABC免疫组化法说明书操作。DAB显色后,显微镜下观察并摄像,应用Image-pro plus5.0图象分析软件计算平均光密度值(Optical density mean):每只大鼠取3张切片采集免疫组化染色图象,在400倍下,每张切片随机取5个视野进行图像分析,并行平均光密度值测定分析。阴性对照组以PBS替代一抗。

1.2.6统计学处理 所有指标数据采用EXCEL录入,使用SPSS12.0统计软件分析系统,数据以($\bar{x}\pm s$)表示,统计采用方差分析,组间两两比较采用SNK-q检验分析,各组数据均经正态检验及方差齐性检验,检验水准取$\alpha=0.05$行双侧检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 水迷宫检测结果

由表1可见,随着训练天数的增加,各组平均潜伏期逐渐缩短。AD组大鼠每天隐匿平台逃避潜伏期均明显长于SC组,差异有统计学意义($P<0.05$),FNS组较AD组明显缩短,差异有统计学意义($P<0.05$),DNS组与AD组比较第1~5d差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 FNS对AD大鼠海马区GFAP免疫阳性细胞数量、GFAP表达灰度的影响

SC组大鼠脑组织海马区可见淡染星形胶质细胞,无反应性肥大增生,细胞突起细小规则,核较小,呈卵圆形,细胞轮廓清晰(图1)。AD组、DNS组大鼠脑组织海马区可见星形胶质细胞染色明显增强,深棕黄色,数量增生,为反应性星形胶质细胞,表现为胞体肥大,突起变粗、分支增多延长,为蜘蛛形细胞,胞核增大,呈圆形或卵圆形,淡染(图2、4),说明星形胶质细胞被$A\beta_{1-40}$诱导后,GFAP表达明显增多。FNS组大鼠脑组织海马区星形胶质细胞增生不明显,数量较AD组、DNS组明显减少,细胞突起减少,分叉少,形态趋于正常(图3)。光密度结果统计分析显示,FNS组和AD组海马区GFAP差异有显著意义(表2)。

表2 FNS对AD大鼠海马CA1区GFAP表达的影响
(平均光密度)($\bar{x}\pm s$)

	SC 组	AD 组	DNS 组	FNS 组
GFAP	0.26±0.07	0.66±0.06#	0.68±0.09#▲	0.43±0.07#△

注:与 SC 组比较,#$P<0.05$;与 AD 组比较,△$P<0.05$;与 AD 组比较,▲$P>0.05$。

表1 各组大鼠5d水迷宫试验潜伏期比较(s,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	第 1d	第 2d	第 3d	第 4d	第 5d
SC	10	39.03±20.95	27.40±18.15	19.50±17.62	16.42±18.44	14.58±14.11
AD	10	98.25±17.75#	83.57±19.58#	73.78±16.13#	72.15±16.12#	69.88±21.88#
FNS	10	73.68±25.69△#	58.05±18.53△#	44.10±13.87△#	37.98±17.94△#	33.38±16.60△#
DNS	10	97.53±15.02▲#	86.48±15.39▲#	74.55±18.46▲#	72.45±19.93▲#	73.40±16.21▲#

注:与 SC 组比较,#$P<0.05$;与 AD 组比较,△$P<0.05$;与 AD 组比较,▲$P>0.05$。

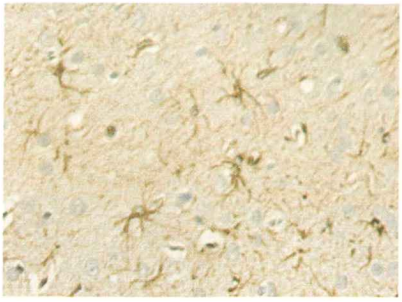


图1　SC组28d海马GFAP阳性细胞(DAB染色×400)

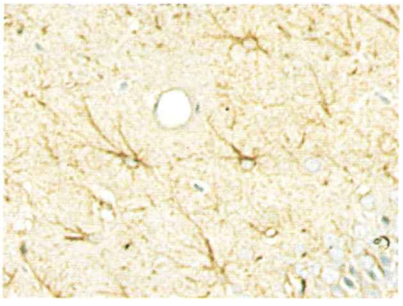


图2　AD组28d海马GFAP阳性细胞(DAB染色×400)

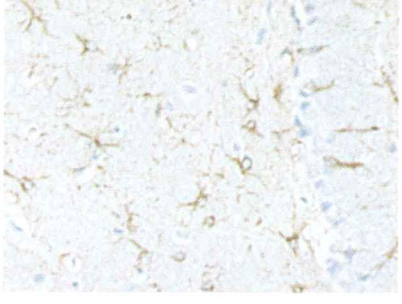


图3　FNS组28d海马GFAP阳性细胞(DAB染色×400)

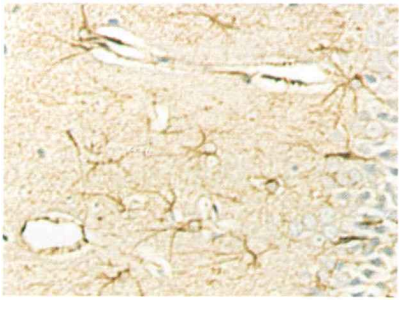


图4　DNS组28d海马GFAP阳性细胞(DAB染色×400)

3　讨论

近年来对FNS启动预防性及治疗性中枢神经源性神经保护机制的研究表明，通过FNS治疗可增加局部脑血流，减轻兴奋性神经毒性作用，保护神经组织结构，促进神经功能恢复[4]。研究发现[5]，通过电极，将仿生物电无创引入小脑顶核的小脑顶核电刺激仪对实验性血管性痴呆有治疗和预防作用，可保护神经组织结构，促进神经功能恢复，但有关FNS预防和治疗AD的机制尚不明确。

本研究发现，Aβ_{1-40}注入大鼠右侧海马28d后，Morris水迷宫试验中，大鼠出现明显的空间学习记忆障碍。造模前2d分别给予FNS 1次(各1h)的大鼠空间学习记忆能力虽低于假手术组，但较AD组显著提高，DNS组则无此作用。提示FNS对AD大鼠空间学习记忆能力有明显的改善作用，一定程度上可预防Aβ_{1-40}导致的大鼠记忆和认知功能下降。谭兴林等[6]在电刺激小脑顶核防治血管性痴呆的实验研究中也发现通过FNS治疗可明显减轻脑缺血11周后血管性痴呆大鼠的学习和记忆障碍。本实验中假手术组大鼠脑组织海马区可见淡染星形胶质细胞，无反应性肥大增生。AD组、DNS组大鼠脑组织海马区可见星形胶质细胞增生明显，为反应性星形胶质细胞。FNS组大鼠脑组织海马区星形胶质细胞增生不明显，数量较AD组、DNS组明显减少，细胞突起减少，分叉少，形态趋于正常。可见FNS可抑制AD大鼠海马CA1区GFAP的表达而与预刺激齿状核组则无此效果。

在AD发病机制中，异常的Aβ的聚集是形成AD病理改变的关键。传统的观点是异常Aβ聚集激活AS，AS激活促进Aβ沉积，形成恶性循环，促进AD病理改变发生。但Jacobse等[2]研究发现，小于18月龄的TG转基因AD鼠脑中Aβ总量无明显增加，但AS确处于激活状态—表现为GFAP表达显著增强且出现胞体增大改变。Takano等[7]通过组织学研究发现，发病2～4月的早期AD模型鼠脑血管周围的Aβ沉积也与AS对局部微循环调节障碍有关，AS的异常激活导致Ca^{2+}内流的增加，产生血管收缩异常和不稳定性增加，血管的功能障碍对Aβ沉积和代谢均有影响。

有关AD发病中AS作用机制的研究迄今尚未阐明，AS既参与了AD的发生、发展，又有一定神经保护性作用。随年龄的增加AS可发生功能障碍，导致其神经保护作用下降，促进神经元的老化进程。作用于激活后AS及其所分泌的细胞因子的治疗途径可能是一个新的老年性痴呆治疗靶点。本研究表明FNS对AD大鼠学习和记忆功能有一定改善，并可抑制AD大鼠海马CA1区GFAP表达，提示FNS对AD有一

(下转第 66 页)

结合酶E3参与了PD发病机制,有望成为PD诊断的生物标志物。

本试验采用双向凝胶电泳结合质谱分析对帕金森病组和正常对照组进行了蛋白组学研究。试验结果显示:两组中的个别蛋白质点表达有差异。这种差异可为探索PD病因和发病机制提供分子生物学依据,这些差异蛋白质亦有可能成为PD分子诊断标志物。

参 考 文 献

[1] 彭国光,董为伟.帕金森病神经保护性治疗研究进展[J]. 中华老年医学杂志,2003;22(8):505-507.

[2] 张玉平,彭国光.帕金森病患者脑脊液蛋白的双向凝胶电泳图谱初步分析[J].中国神经精神疾病杂志,2006;32(4):336-339.

[3] 孙太欣, 彭国光. 双向凝胶电泳脑脊液蛋白质提取方法的比较[J].中国医药生物技术,2007;2(3):172-176.

[4] Davidsson P,Westman-Brinkmalm A,Nilsson CL,et al. Proteome analysis of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer patients [J]. Neuroreport,2002;13(5):611-615.

[5] Yuan X,Russell T,Wood G,et al. Analysis of the human lumbar cerebrospinal fluid proteome[J]. Electrophoresis,2002;23(7-8):1185-1196.

[6] Yan JX,Wait R. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry[J]. Electrophoresis,2000;21(17):3666-3672.

[7] Ukkola O,Rankinen T,Lakka T,et al. Protein tyrosine phosphatase 1B variant associated with fat distribution and insulin metabolism[J]. Obes Res,2005;13(5):829-834.

[8] van Montfort RL,Congreve M,Tisi D,et al. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B[J]. Nature,2003;423(6941):773-777.

[9] Bedlack RS,Strittmatter WJ. Apolipoprotein E and Neuromuscular Disease[J]. Arch Neurol,2000;57(11):1561-1565.

[10] Sherman MY,Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins:a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases [J]. Neuron,2001;29(1):15-32.

(上接第 54 页)

定预防和治疗作用,其预置性保护作用,可能对老年痴呆高危人群有一级及二级预防作用。

参 考 文 献

[1] Kozlov AS,Angulo MC,Audinat E,et al. Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006;103(26):16058-16063.

[2] Jacobsen JS,Wu CC,Redwine JM,et al. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2006;103(13):5161-5166.

[3] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coodinate fourth edition[M]. Academic press,1998.80-89.

[4] Glickstein SB, Golanov EV,Reis DJ. Intrinsic neurons of fastigial nucleus mediate neurogenicneuroprotection against excitotoxic and ischemic neuronal injury in rat[J]. J Neurosci,1999;19(10):4142-4154.

[5] Wen HF. Effect of electrical stimulation of fastigial nucleus on cognitive Ability in rats with vascular dementia[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation,2004;8(34):7821-23.

[6] 谭兴林,董为伟,杨期东.电刺激小脑顶核防治血管性痴呆的实验研究[J]. 卒中与神经疾病杂志,2004;11(6):349-352.

[7] Takano T,Han X,Deane R,et al.Two-photon imaging of astrocytic Ca2+ signaling and the microvasculature in experimental mice models of Alzheimer's disease[J]. Ann N Y Acad Sci,2007;1097:40-50.

第九届全国神经生化会议将于
2009 年 5 月在湖南长沙举行,欢迎届时参加!