基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001296

早期营养不良上调成年期 SD 大鼠海马小胶质细胞活化水平

陈　轩，王永红，周永俪，王小林
（重庆医科大学附属第一医院神经内科，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：研究早期营养不良对成年期 SD 大鼠海马小胶质细胞活化水平的影响。**方法**：建立早期营养不良 SD 大鼠模型，建模结束后给予 n-3 多不饱和脂肪酸（n-3-polyunsaturated fatty acid，n3-PUFA）干预。检测仔鼠体质量，Morris 水迷宫实验和场景恐惧实验检测学习记忆能力，RT-qPCR 和 Western blot 检测海马小胶质细胞 M1 型标志物诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）、环氧合酶-2（cyclooxygenase-2，COX-2）mRNA 和蛋白的表达，免疫组化检测海马小胶质细胞标志物离子钙结合配适分子-1（ionized calcium-binding adapter molecule-1，IBA-1）的表达。**结果**：早期营养不良组仔鼠出生后体质量偏低（P=0.000），成年期学习记忆能力下降，iNOS mRNA 表达增加（P=0.002），iNOS 蛋白表达增加（P=0.015），IBA-1 表达增加（P=0.047）。给予 n3-PUFA 补充后可以减少小胶质细胞 M1 型转化，降低活化水平。**结论**：早期营养不良可以上调仔鼠成年期海马小胶质细胞活化水平，诱导 M1 型转化，可能与神经炎症的发生相关。

【关键词】早期营养不良；小胶质细胞；认知障碍；神经炎症
【中图分类号】R741.02；R338.64　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-05-23

Effect of early malnutrition on up-regulation of activation of microglia in adult SD rat hippocampal

Chen Xuan, Wang Yonghong, Zhou Yongli, Wang Xiaolin
(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effect of early malnutrition on the activation of microglia in the hippocampus of adult rats. ***Methods***: Early malnutrition model was established in SD rat, and all rats were given supplement of n-3-polyunsaturated fatty acid (n3-PUFA) after lactation. Weight of newborn rats was measured. The ability of learning and memory of offspring rats were assayed by Morris water maze and the fear conditioning. Real-time quantitative PCR and Western blot were used to assay the expression of microglia M1 markers such as inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) in the hippocampus. The expressions of microglia marker Ionized calcium binding adapter molecule-1 (IBA-1) in the hippocampus were detected by immunohistochemistry. ***Results***: The early malnutrition group was born with lower birth weight (P=0.000). After postnatal 90 days, the ability of learning and memory was reduced; the expression of iNOS was increased both in mRNA (P=0.002) and protein (P=0.015); the expression of IBA-1 was increased (P=0.047). Supplementation of n3-PUFA could reduce M1 type conversion and the activation of microglia. ***Conclusion***: Early malnutrition may lead to up-regulation of activation of microglia and increasing of M1 phenotypic transformation in adult offspring, which may be related to the occurrence of neuroinflammation in hippocampus of adulthood.

【Key words】early malnutrition; microglia; cognitive impairment; neuroinflammation

流行病学研究发现，生命早期经历灾荒等不良事件与成年期多种慢性疾病发生相关，如代谢综合征、高血压、冠状动脉性心脏病、精神分裂症[1-2]，以及认知障碍[3]。一些研究发现，营养物质的缺乏可导致内环境紊乱，诱导神经炎症发生[4]，导致认知功能下降并与阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD）的发生相关[5-6]，但目前有关生命早期营养不良是否可以引起后代成年期神经炎症的发生尚无相关研究。基于小胶质细胞功能障碍所引起神经系统慢性炎症是 AD 发生的重要机制[7-8]，本实验通过研究早期营养不良大鼠模型大脑海马组织小胶质细胞 M1 表型标志物诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）、环氧合酶-2（cyclooxygenase-2，COX-2）和激活标志物离子钙结合配适分子-1（ionized calcium-binding adapter molecule-1，IBA-1）表达的变化，并在哺乳期后给予具有调节小胶质细胞表型和功能，减轻其所致的神经炎症作用的 n-

作者介绍：陈　轩，Email：453731253@qq.com，
研究方向：认知障碍，阿尔茨海默病。
通信作者：王永红，Email：wyh0232983@163.com。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170609.1053.002.html
（2017-06-09）

3多不饱和脂肪酸(n-3-polyunsaturated fatty acid, n3-PUFA)干预[9],探讨早期营养不良是否可以影响小胶质细胞活化水平从而对成年期神经系统产生影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物模型的建立与分组 于重庆医科大学实验动物中心购买 8 只健康成年、有准确受孕记录的 SPF 级 SD 孕鼠,随机分配为早期营养不良组(early malnutrition,EM)和对照组(control,CTL),每组 4 只,单笼饲养于重庆医科大学实验动物中心 SPF 级动物房[恒温(20±2) ℃、12 h/12 h 明暗交替)。EM 组大鼠采用 Coupé[10]半量饮食造模方法,于孕 14 d 给予饮食干预,具体方案:E14-E21 为 12 g/d,E21-P6 为 22 g/d,P7-P13 为 27~31 g/d,P14-P21 为 35~40 g/d,CTL 组正常饮食。每只母鼠均哺乳相同数量的仔鼠(9 只)以保证每只仔鼠哺乳均衡。仔鼠 21 日龄时脱离母鼠饲养,根据是否给予 n3-PUFA 干预,EM 组随机分为 EM-n3-PUFA 补充组(EM-n3)和 EM-正常饮食组(EM-normal diet,EM-ND);CTL 组随机分为 CTL-n3-PUFA 补充组(CTL-n3)和 CTL-正常饮食组(CTL-normal diet,CTL-ND),每组 10 只,饲养至成年(3 月龄)。EM-n3 组和 CTL-n3 组在成年前期进行干预,即 21 d起在饲料中添加 4%鱼油(含 1% n3-PUFA),补充 1 个月[11]。动物饲料由重庆医科大学实验动物中心提供,含蛋白质18%、脂肪 4%、碳水化合物 60%、微量元素适量。本研究符合重庆医科大学动物实验伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.1.2 主要试剂 深海鳕鱼油(美国 Nordic Naturals 公司)、RNAiso plus 总 RNA 提取试剂(日本 TaKaRa 公司)、即用型荧光定量 PCR Mix 和染料法荧光定量 PCR 预混液(南京诺唯赞生物科技有限公司)、兔抗 IBA-1 单克隆抗体、兔抗 iNOS 多克隆抗体、兔抗 COX-2 多克隆抗体(英国 Abcam 公司)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒和超敏 ECL 化学发光试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所)、羊抗兔 IgG/HRP、免疫组化染色试剂盒和 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)、磷酸化蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 Morris 水迷宫实验 仔鼠饲养至 3 月龄时进行 Morris 水迷宫实验检测学习记忆能力,正式实验前 1 d 将仔鼠放入水迷宫实验室饲养并下水自由游泳 2 min 以适应实验环境。实验内容包括两个阶段。①隐蔽站台实验:实验 4 次/d,每天仔鼠分别从 4 个不同点面壁下水,共 5 d,记录 60 s 内找到隐藏在水面下的平台的时间(逃避潜伏期)。②空间探索实验:实验 1 d,撤去平台,仔鼠从平台对侧象限点面壁下水,记录 60 s 内游泳轨迹、穿越平台次数、平台象限活动时间。

1.2.2 场景恐惧实验 仔鼠于 3 月龄时进行场景恐惧实验检测,实验前 1 d 将仔鼠放入场景恐惧实验室饲养以适应实验环境。实验由 3 个阶段构成。①训练期:第 1 天,将仔鼠放入斯金纳箱,适应 120 s 后,给予声音刺激(85 dB、2 800 Hz)20 s,在声音刺激的最后 2 s 给予 0.5 mA 的足底电击刺激,重复 4 次,周期 110 s,记录凝滞时间(%)和凝滞次数。②场景恐惧测试期:第 2 天,将仔鼠置于斯金纳箱 560 s,不给予任何刺激,记录凝滞时间和凝滞次数。③声音刺激恐惧测试期:第 3 天,将仔鼠放入斯金纳箱适应 120 s 后,给予声音刺激(85 dB、2 800 Hz)20 s,重复 4 次,周期 110 s,记录凝滞时间和凝滞次数。每只仔鼠完成实验后用 75%酒精彻底清洁箱底和箱壁,以避免残留气味对后续实验仔鼠的影响。实验数据由 Freeze Frame 系统(上海欣软公司)记录和分析。

1.2.3 qRT-PCR 检测 分别于仔鼠 21 日龄和 3 月龄检测 iNOS、COX-2 的表达。采用 10%水合氯醛(0.35 mL/100 g 腹腔注射)麻醉仔鼠,断头冰上取海马组织 100 mg,匀浆后按照 RNAiso Plus 试剂说明书提取总 RNA,ThermoNanoDrop 2000/2000c 微量分光光度计检测 RNA 浓度。逆转录 cDNA 和荧光定量 PCR 过程按照试剂说明书操作,每个样本设置 3 个重复,扩增条件:95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 10 s、60 ℃退火延伸 34 s,重复 40 个循环。引物由上海生工设计合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

基因	引物序列
iNOS	正义链:CTCAGCAGCATCCACGCCAAGAA
	反义链:CCTCGAAGGTGAGTTGAACAAGGAG
COX-2	正义链:TACAACAACTCCATCCTCCTTG
	反义链:TTCATCTCTCTGCTCTGGTCAA
β-actin	正义链:CCCATCTATGAGGGTTACGC
	反义链:TTTAATGTCACGCACGATTTC

1.2.4 Western blot 检测海马 iNOS、COX-2 表达水平 分别取 21 日龄和 3 月龄仔鼠海马组织 100 mg,匀浆后加入裂解液提取蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,加入 1/4 蛋白体积的 5×上样缓冲液 95 ℃水浴 10 min,行 SDS-PAGE 电泳,PVDF 膜转膜 1 h,5%脱脂奶粉封闭 1 h;分别加入一抗 iNOS、COX-2 多克隆抗体(1:1 000)及 β-actin 抗体(1:1 000),4 ℃孵育过夜。TBST 洗膜;加入 HRP 标记的二抗(1:5 000)37 ℃孵育 1 h,TBST 洗膜 4 次;ECL 试剂盒显色。使用 Quantity One 软件测定各条带的平均光密度值。

1.2.5 免疫组化(IHC)检测海马 IBA-1 表达水平 分别于仔鼠 21 日龄和 3 月龄时,采用 10%水合氯醛(0.35 mL/100g 腹腔注射)麻醉仔鼠,剪开胸骨暴露心脏,先后用 PBS 和 4%多聚甲醛溶液灌注,取脑放入装有 4%多聚甲醛溶液的试管,4 ℃过夜后进行石蜡包埋、切片。免疫组化采用 SP 法:海马组织石蜡切片脱蜡脱水,枸橼酸盐修复,室温冷却后滴加 3% H2O2 37 ℃孵育 15 min,山羊血清 37 ℃封闭 30 min 后滴加一抗(IBA-1,1:500)4 ℃过夜;37 ℃复温 1 h,二抗 37 ℃孵育 30 min,链霉卵白素工作液 37 ℃孵育 30 min,DAB 显色镜下观察,苏木素复染、碳酸锂返蓝、脱水、透明、烤干、中性树脂封片。采用 PBS 代替一抗作为阴性对照。每只仔鼠选取 3 张切片,摄取海马 CA1 区和 CA3 区的视野,图像用 Image Pro Plus 6.0 软件测定阳性物质的累积光密度值(IOD SUM)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件,所有数值以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据进行正态性和方差齐性检验,不符合正态性的数

据进行对数转换，两组间比较采用两独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐时组间两两比较采用 LSD-t 检验，方差不齐时采用 Tamhane's $T2$ 检验。检验水准 α=0.05。统计图采用 Graphpad Prism 5 软件绘制。

2 结 果

2.1 仔鼠体质量比较

两组仔鼠出生后体质量有统计学差异。如表 2 所示：出生后第 1 天，EM 组仔鼠和 CTL 组仔鼠体质量相比为[(5.29 ± 0.97) g vs. (6.97 ± 0.76) g，t=-5.814，P=0.000]；第 7 天为[(11.15 ± 3.20) g vs. (16.75 ± 2.17) g，t=-5.994，P=0.000]第 14 天为[(16.67 ± 5.05) g vs. (31.36 ± 5.41) g，t=-8.332，P=0.000]；第 21 天为[(23.02 ± 5.17) g vs. (52.92 ± 6.63) g，t=-14.778，P=0.000]。

表 2 仔鼠出生后体质量比较（g，n=36）

Tab.2 Comparison of postnatal weight of newborn rats(g，n=36)

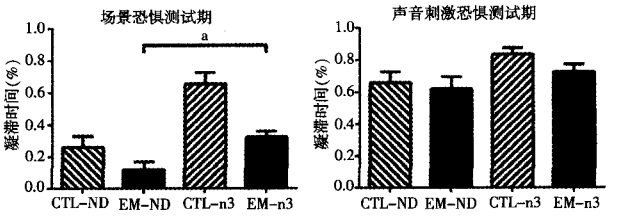
组别	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
CTL组	6.97 ± 0.76	16.75 ± 2.17	31.36 ± 5.41	52.92 ± 6.63
EM组	5.29 ± 0.97	11.15 ± 3.20	16.67 ± 5.05	23.02 ± 5.17
t 值	-5.814	-5.994	-8.332	-14.778
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 Morris 水迷宫实验

隐蔽站台实验中，和 CTL-ND 组相比，EM-ND 组仔鼠逃避潜伏期在第 4 天[(21.47 ± 14.10) s vs. (10.77 ± 6.57) s，P=0.028]、第 5 天[(17.15 ± 8.75) s vs. (10.28 ± 4.79) s，P=0.027]均明显延长；和 EM-ND 组相比，EM-n3 组在第 1 天[(34.19 ± 15.12) s vs. (47.33 ± 8.86) s，P=0.034]和第 5 天[(9.37 ± 4.97) s vs. (17.15 ± 8.75) s，P=0.01]则明显减少，见表 3。空间探索实验中，CTL-ND 组、EM-ND 组、CTL-n3 组和 EM-n3 组平台象限活动时间分别为(18.18 ± 3.01) s、(14.27 ± 2.71) s、(21.19 ± 4.26) s、(19.27 ± 3.46) s，EM-ND 组和 CTL-ND 组相比无统计学差异(P=0.089)，EM-n3 组时间则多于 EM-ND 组(P=0.034)。穿越平台次数上，CTL-ND 组、EM-ND 组、CTL-n3 组和 EM-n3 组穿越平台次数分别为 2.60 ± 0.54、1.20 ± 0.83、3.00 ± 0.71、2.40 ± 1.14，EM-ND 组和 CTL-ND 组相比无统计学差异(P=0.097)。

2.3 场景恐惧实验

场景恐惧测试期，CTL-ND 组、EM-ND 组、CTL-n3 组和 EM-n3 组凝滞时间(%)分别为(0.26 ± 0.15)%、(0.12 ± 0.11)%、(0.66 ± 0.16)%、(0.32 ± 0.08)%。其中 EM-n3 组较 EM-ND 组明显延长(P=0.037)，而 EM-ND 组和 CTL-ND 组相比无统计学差异(P=0.110)。声音刺激恐惧测试期中，CTL-ND 组、EM-ND 组、CTL-n3 组和 EM-n3 组凝滞时间(%)分别为(0.66 ± 0.16)%、(0.62 ± 0.16)%、(0.83 ± 0.08)%、(0.72 ± 0.09)%。各组间无统计学差异(F=2.167，P=0.138)，如图 1 所示。



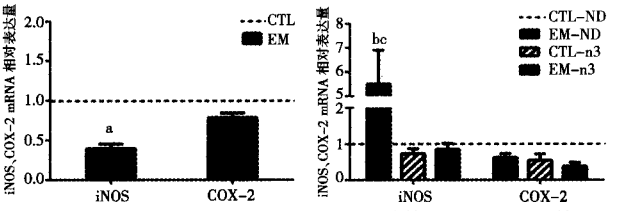
a：EM-ND 组与 EM-n3 组比较，P=0.037

图 1 场景恐惧凝滞时间（%）

Fig.1 Freezing time of fear conditioning（%）

2.4 qRT-PCR

如图 2 所示，21 日龄时，EM 组较 CTL 组(为基线 1.0 水平)iNOS、COX-2 的 mRNA 表达降低，其中 iNOS 相对表达量为 0.40 ± 0.10，具有统计学意义(t=-3.777，P=0.019)。3 月龄时，EM-ND 组较 CTL-ND 组(为基线 1.0 水平)iNOS 的 mRNA 表达增多，相对表达量为(5.49 ± 2.81，P=0.002)；EM-ND 组亦较 EM-n3 组明显增高，相对表达量为(6.45 ± 3.30，P=0.002)，COX-2 在各组间表达亦无统计学差异(F=2.536，P=0.122)。



A. 21 日龄 iNOS、COX-2 的 mRNA 相对表达水平

B. 3 月龄 iNOS、COX-2 的 mRNA 相对表达水平

a：与 CTL 组比较，P=0.019；b：与 CTL-ND 组比较，P=0.002；c：与 EM-n3 组比较，P=0.002

图 2 仔鼠 iNOS、COX-2 mRNA 表达水平

Fig.2 Expression of iNOS and COX-2 mRNA in filial rats

表 3 各组逃避潜伏期的比较（s，n=20）

Tab.3 Comparison of escape latency in each group（s，n=20）

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
CTL-ND组	50.50 ± 7.17	23.34 ± 21.83	16.84 ± 14.86	10.77 ± 6.57	10.28 ± 4.79
EM-ND组	47.33 ± 8.86	24.73 ± 19.71	23.31 ± 16.62	21.47 ± 14.10[a]	17.15 ± 8.75[b]
CTL-n3组	38.10 ± 14.25	17.02 ± 18.07	14.76 ± 7.07	9.58 ± 6.08	7.80 ± 4.53
EM-n3组	34.19 ± 15.12[c]	26.38 ± 21.33	19.30 ± 15.00	15.80 ± 10.78	9.37 ± 4.97[d]
F 值	3.169	0.813	1.400	5.962	9.422
P 值	0.029	0.491	0.249	0.001	0.000

注：a，与同时段 CTL-ND 组比较，P=0.028；b：与同时段 CTL-ND 组比较，P=0.027；c：与同时段 EM-ND 组比较，P=0.034；d：与同时段 EM-ND 组比较，P=0.01

2.5 Western blot 检测海马 iNOS、COX-2 的表达

如图 3、图 4 所示，21 日龄时，EM 组海马 iNOS 相对表达量低于 CTL 组，相对光密度值为 0.67 ± 0.32 vs. 0.84 ± 0.10，但无统计学意义（t=0.877，P=0.430），COX-2 为 1.02 ± 0.21 vs. 1.21 ± 0.02，亦无统计学差异（t=1.586，P=0.251）。3 月龄时，CTL-ND 组、EM-ND 组、CTL-n3 组和 EM-n3 组的 iNOS 相对光密度值分别为 0.89 ± 0.09、1.19 ± 0.11、1.03 ± 0.02、0.87 ± 0.04，其中 EM-ND 组 iNOS 表达明显高于其他 3 组，EM-ND 组和 CTL-ND 组相比 P=0.015、EM-ND 组和 EM-n3 组相比 P=0.013；3 月龄时 CTL-ND 组、EM-ND 组、CTL-n3 组和 EM-n3 组的 COX-2 相对光密度值分别为 0.92 ± 0.04、0.88 ± 0.02、0.86 ± 0.23、0.76 ± 0.02，各组间无统计学差异（F=0.714，P=0.593）。

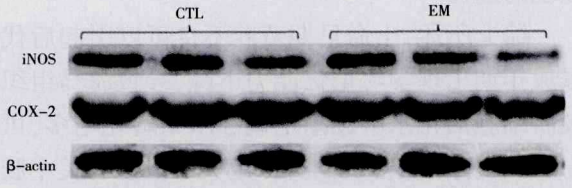


图 3 21 日龄仔鼠 iNOS、COX-2 蛋白表达水平

Fig.3 Expression of iNOS and COX-2 protein in postnatal 21d rats

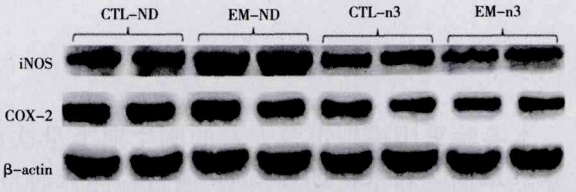
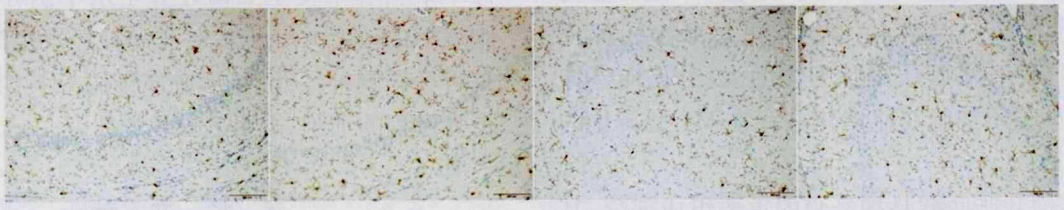


图 4 3 月龄仔鼠 iNOS、COX-2 蛋白表达水平

Fig.4 Expression of iNOS and COX-2 protein in 3 months old rats

2.6 IHC 检测海马 IBA-1 的表达

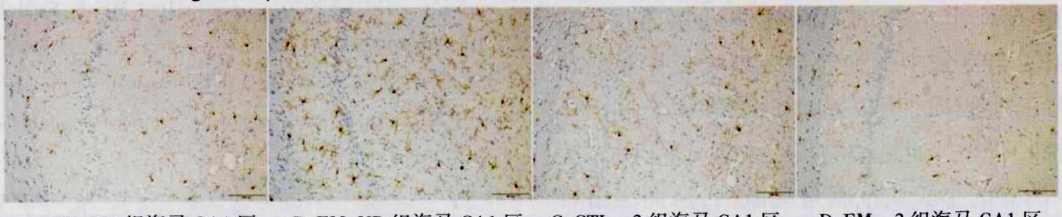
如图 5 所示，21 日龄时，EM 组海马 CA1 区和 CA3 区小胶质细胞表达（棕色颗粒）多于 CTL 组；检测其平均 IOD SUM，CA1 区 EM 组比 CTL 组为 2633.25 ± 638.10 vs. 1487.83 ± 500.12（t=3.334，P=0.009），CA3 区为 1581.46 ± 370.84 vs. 1145.56 ± 387.68，差异无统计学意义（t=1.902，P= 0.090）。3 月龄时，EM-ND 组海马 CA1 区和 CA3 区小胶质细胞表达明显多于 CTL-ND 组，EM-ND 组 CA1 区和 CA3 区平均 IOD SUM 分别为 1 800.70 ± 859.20、1 463.98 ± 496.29，CTL-ND 组分别为 1 058.81 ± 244.30、652.16 ± 468.06，其中 CA1 区具有统计学意义（t=2.320，P=0.047），如图 6 所示。EM-n3 组 CA1 区和 CA3 区棕色颗粒则较 EM-ND 组明显减少，其 CA1 区和 CA3 区平均 IOD SUM 分别为 835.72 ± 195.66、691.70 ± 150.22，与 EM-ND 组相比，CA1 区 t=3.097，P=0.015；CA3 区 t=4.213，P=0.003。如图 7 所示。



A. CTL 组海马 CA1 区　B. EM 组海马 CA1 区　C. CTL 组海马 CA3 区　D. EM 组海马 CA3 区

图 5 21 日龄仔鼠海马 IBA-1 表达（200×）

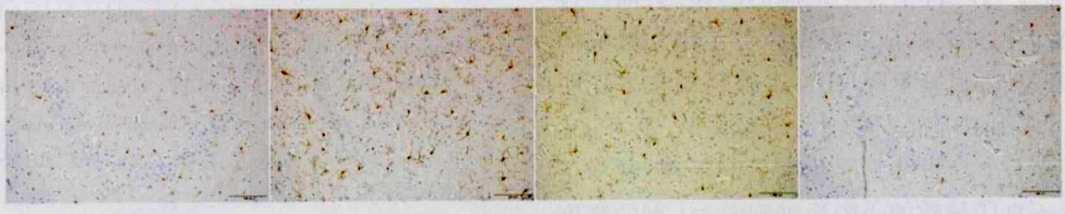
Fig.5 Expression of IBA-1 in the hippocampus of postnatal 21d rats(200×)



A. CTL-ND 组海马 CA1 区　B. EM-ND 组海马 CA1 区　C. CTL-n3 组海马 CA1 区　D. EM-n3 组海马 CA1 区

图 6 3 月龄仔鼠海马 CA1 区 IBA-1 表达（200×）

Fig.6 Expression of IBA-1 in the hippocampus CA1 of 3 months old rats(200×)



A. CTL-ND 组海马CA3区　B. EM-ND 组海马 CA3 区　C. CTL-n3 组海马 CA3 区　D. EM-n3 组海马 CA3 区

图 7 3 月龄仔鼠海马 CA3 区 IBA-1 表达（200×）

Fig.7 Expression of IBA-1 in the hippocampus CA3 of 3 months old rats(200×)

3 讨 论

本实验采用模拟饥荒人群的围生期半量饮食法建立早期营养不良动物模型，通过检测体质量，证明模型构建成功。Morris 水迷宫实验和场景恐惧实验中的场景恐惧测试期都反映实验动物的与海马相关的学习记忆能力。本实验通过以上实验方法验证了早期营养不良模型在成年期会出现与海马相关的学习记忆能力下降。

在 AD 发病的炎症机制学说中，早期小胶质细胞可通过吞噬降解功能清除 Aβ，并通过 M2 表型激活途径减轻炎症反应，而随着病情发展，当小胶质细胞出现过度激活时会发生 M1 表型途径的激活和 M2 表型的抑制[12]，从而过度表达促炎症因子和活性氧，产生神经毒性[13-14]。IBA-1 是小胶质细胞的特异性标志物，反映小胶质细胞的形态，并在小胶质细胞激活的过程中表达增加。在本研究中，成年期早期营养不良大鼠海马组织小胶质细胞 M1 型标志物 iNOS 表达高于对照组，免疫组化可见 IBA-1 棕色颗粒明显表达，小胶质细胞胞体增大、分支向外伸展，表明小胶质细胞明显活化并存在 M1 型转化的增加。

多不饱和脂肪酸是神经膜的重要组成部分，其在大脑的堆积在哺乳期达到高峰，已有研究证明它具有抗炎抗氧化、促进神经系统发育、改善学习记忆能力的重要作用。Madore 等[15]发现小鼠婴儿期缺乏 n3-PUFA 会导致中枢神经系统处于炎症激活状态，同时伴有小胶质细胞表型的改变和促炎症因子表达的增加。Ji 等[16]通过动物实验发现 n3-PUFA 能减少 LPS 诱导的小胶质细胞过度激活，从而缓解神经损害。本研究中补充 n3-PUFA 的对照组大鼠成年后在行为学实验中较正常饮食对照组有更佳的表现，验证了其改善学习记忆能力的作用，而经过 n3-PUFA 干预过后的成年早期营养不良大鼠的海马中 iNOS 表达明显下降、IBA-1 棕色颗粒表达明显减少，小胶质细胞胞体减小、突起减少，表明 n3-PUFA 参与了小胶质细胞活化水平的下调，减少了早期营养不良所导致的小胶质细胞向 M1 型的高度转化。

此外，在本研究结果中，21 日龄时早期营养不良鼠海马组织 iNOS、COX-2 的 mRNA 表达低于对照组，但其组化结果显示小胶质细胞活化程度高于对照组。此结果表明早期营养不良初期大鼠海马组织可能并非处于一种炎症激活状态，尽管小胶质细胞活化水平较高，但其表型可能更多存在的是 M2 型。随着年龄的发展，逐渐发生小胶质细胞的激活和 M1 型转化的增加。Scheffel 等[17]用基因芯片分析生后 0 d 的小鼠大脑小胶质细胞的表型，同样得到 M1 表型基因表达相对减少，同时 M2 增多的结果。这一现象反映出早期营养不良对小胶质细胞激活和表型转化的影响可能是一个慢性的、成年期才能显现的过程。

综上所述，生命早期营养不良可以引起后代仔鼠成年期出现学习记忆能力下降，导致海马组织小胶质细胞活化水平逐渐上调、M1 型转化增多，可能与 AD 发病的炎症机制有一定关系。但有关小胶质细胞活化水平上调之后是否会出现与神经炎症发生相关的吞噬功能和炎症介质表达的改变，以及生命早期营养不良是如何在分子水平诱导小胶质细胞表型的改变并一步步对海马神经发生产生影响，是否会影响神经元、星形胶质细胞等其他参与神经炎症过程的细胞，需要进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Pasternak Y, Aviram A, Poraz I, et al. Maternal nutrition and offspring's adulthood NCD's:a review[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2013, 26(5): 439-444.

[2] Li Y, Jaddoe VW, Qi L, et al. Exposure to the chinese famine in early life and the risk of metabolic syndrome in adulthood[J]. Diabetes Care, 2011, 34(4): 1014-1018.

[3] Hoeijmakers L, Lucassen PJ, Korosi A. The interplay of early-life stress, nutrition, and immune activation programs adult hippocampal structure and function[D]. Front Mol Neurosci, 2014, 7: 103.

[4] Ke ZJ, Gibson GE. Selective response of various brain cell types during neurodegeneration induced by mild impairment of oxidative metabolism[J]. Neurochem Int, 2004, 45(2-3): 361-369.

[5] Morris MS, Selhub J, Jacques PF. Vitamin B-12 and folate status in relation to decline in scores on the mini-mental state examination in the framingham heart study[J]. J Am Geriatr Soc, 2012, 60(8): 1457-1464.

[6] Zhuo JM, Praticò D. Acceleration of brain amyloidosis in an Alzheimer's disease mouse model by a folate, vitamin B6 and B12-deficient diet[J]. Exp Gerontol, 2010, 45(3): 195-201.

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001294

HMGB1在脓毒症心肌损害小鼠中的表达及炎症促进作用研究

冯宣云，艾山木，刘　琼

（重庆医科大学附属第一医院急诊医学科 & 重症医学科，重庆　400016）

【摘　要】目的：探究高迁移率族蛋白 B1（high mobility group box-1 protein，HMGB1）在脓毒症心肌损害（sepsis induced myocardial depression，SIMD）中的表达以及通过 HMGB1 抑制剂甘草酸（glycyrrhizin，GL）在 SIMD 中的作用。方法：将小鼠分为正常组、盲肠结扎穿孔（cecal ligation and puncture，CLP）模型组、CLP+PBS 对照组和 CLP+GL 干预组，每组随机分配 5 只 C57BL/6 雄性小鼠，通过 ELISA 检测小鼠血清、心脏匀浆液中高迁移率族蛋白 B1（high mobility group box-1 protein，HMGB1）的表达，RT-PCR 对小鼠心肌组织中 HMGB1 进行定量分析，使用 GL 干预 CLP 小鼠模型后检测外周血中肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-6、IL-10、IL-33 等细胞因子水平变化。结果：①CLP 诱导 SIMD 小鼠模型中，HMGB1 以及心肌损害标志物 cTn Ⅰ 的表达较正常对照组明显升高（$P<0.05$）；②GL 处理 SIMD 小鼠模型后，TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10、IL-33 等细胞因子以及心肌损害标志物 cTn Ⅰ 表达较对照组和模型组明显降低（$P<0.01$）。结论：抑制 HMGB1 可降低机体各种炎症因子水平，调控脓毒症的失控性炎症效应，减轻脓毒症心肌损害。

【关键词】高迁移率族蛋白 B1；脓毒症心肌损害；炎症因子

【中图分类号】R542.2　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2017-02-12

作者介绍：冯宣云，Email：841735693@qq.com，
研究方向：脓毒症诱导心肌功能障碍的发病机制。

通信作者：艾山木，Email：cjxywh@qq.com，现工作于第三军医大学大坪医院重症医学科。

优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170608.1135.008.html（2017-06-08）

[7] Glass CK，Saijo K，Winner B，et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration[J]. Cell，2010，140(6)：918-934.

[8] Huang Y，Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies[J]. Cell，2012，148(6)：1204-1222.

[9] Swanson D，Block R，Mousa SA. Omega-3 fatty acids EPA and DHA：health benefits throughout life[J]. Adv Nutr，2012，3(1)：1-7.

[10] Coupé B，Dutriez-Casteloot I，Breton C，et al. Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat[J]. J Neuroendocrinol，2009，21(1)：40-48.

[11] Yang RH，Wang F，Hou XH，et al. Dietary ω-3 polyunsaturated fatty acids improves learning performance of diabetic rats by regulating the neuron excitability[J]. Neuroscience，2012，212：93-103.

[12] Cohon C，Wilcock DM. Assessing activation states in microglia[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets，2010，9(2)：174-191.

[13] Heneka MT，Kummer MP，Stutz A，et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice[J]. Nature，2013，493(7434)：674-678.

[14] Bhaskar K，Maphis N，Xu G，et al. Microglial derived tumor necrosis factor-α drives Alzheimer's disease-related neuronal cell cycle events[J]. Neurobiol Dis，2014，62：273-285.

[15] Madore C，Nadjar A，Delpech JC，et al. Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes[J]. Brain Behav Immun，2014，41：22-31.

[16] Ji A，Diao H，Wang X，et al. n-3 polyunsaturated fatty acids inhibit lipopolysaccharide-induced microglial activation and dopaminergic injury in rats[J]. Neurotoxicology，2012，33(4)：780-788.

[17] Scheffel J，Regen T，Van Rossum D，et al. Toll-like receptor activation reveals developmental reorganization and unmasks responder subsets of microglia[J]. Glia，2012，60(12)：1930-1943.

（责任编辑：方　济）