

神经疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2014.02.002

慢性脑缺血对小鼠脑内星形胶质细胞的影响

王凌晞, 刘 刚, 贺桂琼, 楚亚楠, 宋 冲, 周泽芬, 姚秋会

(重庆医科大学基础医学院解剖学教研室、重庆医科大学神经科学研究中心, 重庆 400016)

【摘 要】目的:研究慢性脑缺血对小鼠脑内星形胶质细胞的影响。**方法:**C57 小鼠, 3 月龄时行改良双侧颈总动脉结扎术, 假手术组对照。甲苯胺蓝染色观察模型有效性。于术后 1、2、4、5、6 个月胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)免疫组化观察小鼠脑内星形胶质细胞的病理改变。免疫印迹检测脑内 GFAP 表达量变化。**结果:**甲苯胺蓝灌注后, 模型 0 h 组大脑冠状切面苍白色, 假手术对照组呈深蓝色。慢性脑缺血后, 星形胶质细胞增生, 表现为细胞数量增多, 胞体肿胀肥大, 突起增多, 变粗, 变长。与假手术对照组比较, 从模型 2 个月组开始, GFAP 阳性细胞数量持续性增多, 染色加深, 累计光密度增强, 且差异均具有统计学意义($P<0.05$)。免疫印迹结果显示, 与假手术对照组比较, 模型 2、4、5、6 个月组脑内 GFAP 表达量增高, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**慢性脑缺血后星形胶质细胞出现持续性增生, 可能在缺血性脑损伤后脑内的不可逆病理改变中有重要意义。

【关键词】慢性脑缺血; 星形胶质细胞; 神经胶质纤维酸性蛋白; 小鼠

【中图分类号】R743

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-28

Effects of chronic cerebral hypoperfusion on astrocytes in mice

Wang Lingxi, Liu Gang, He Guiqiong, Chu Yanan, Song Chong, Zhou Zefen, Yao Qiuhui

(Teaching and Research Section of Anatomy, College of Basic Medicine, Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of chronic cerebral hypoperfusion on astrocytes in mice brain. **Methods:** Three months old C57 mice were subjected to chronic cerebral hypoperfusion with 2 vessels occlusion or sham operation. Anilin blue staining was used to prove the effectiveness of the model. Pathological changes of astrocytes were examined by immunohistochemical staining (IHC) of glial fibrillary acidic protein (GFAP). Western blot was employed to test the levels of GFAP in brain. **Results:** After the Anilin blue perfusion, cerebrum of model 0 h group was not dyed while that of sham control group was dyed dark blue. After chronic cerebral hypoperfusion, astrocytes were proliferated and manifested as cell quantity increase, cellular hypertrophy and processes. Two months after model establishment, number of GFAP positive cells was increased, dying was deepened and integrated optical density was enhanced compared with those in sham control group, with statistical differences ($P<0.05$). Intracerebral GFAP expression in model group was increased significantly compared with that in sham control group, with statistical differences ($P<0.05$). **Conclusions:** Astrocytes are consistently proliferated after chronic cerebral hypoperfusion, which play an important role in irreversible pathological changes after cerebral ischemia.

【Key words】 chronic cerebral hypoperfusion; astrocytes; glial fibrillary acidic protein; mouse

慢性脑缺血即慢性脑血流量灌注不足, 是血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 和阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 中一种常见的病理生理过

作者介绍: 王凌晞, Email: wang_lingxi@126.com,

研究方向: 阿尔茨海默病发病机制与防治。

通信作者: 贺桂琼, Email: guiqionghe@hotmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30970986); 教育部“新世纪优秀人才”支持计划资助项目 (编号: NCET-11-1084); 重庆市首届优秀人才资助计划资助项目 (编号: [渝教人(2009)2 号]); 留学人员科技活动项目择优资助项目 (编号: [渝人社办(2011)235 号])。

程。有研究表明, 慢性脑缺血在神经退行性疾病和认知功能障碍的发生发展中起着关键作用^[1-2]。在缺血性脑损伤中, 星形胶质细胞是出现最早、变化最明显的指标之一^[3]。近年来, 关于脑缺血后星形胶质细胞变化和作用研究成为国内外热点。但关于小鼠慢性脑缺血星形胶质细胞动态变化的研究比较罕见。本研究以改良的双侧颈总动脉结扎模型 (2 vessels occlusion, 2VO) 建立小鼠慢性脑缺血模型, 观察小鼠脑内星形胶质细胞的动态变化, 以期研究这种变化在慢性脑缺血病理改变中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 C57 小鼠(重庆医科大学动物中心),3 月龄,随机分成 6 组:假手术对照组,模型 1 个月组,模型 2 个月组,模型 4 个月组,模型 5 个月组,模型 6 个月组,每组 10 只。另 4 只用于甲苯胺蓝灌注以证实模型的可靠性,分为假手术对照组,模型 0 h 组。

1.2 试剂

二步法免疫组化试剂盒(北京中杉金桥);DAB 试剂盒(北京中杉金桥);GFAP 单克隆抗体(Cell Signaling Technology 公司);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(康为世纪);其他均为国产分析纯。

1.3 模型制作

颈总动脉狭窄术,采用改良 2 VO。腹腔注射 3.5%水合氯醛麻醉,颈正中切开皮肤。钝性分离皮下组织,玻璃分针分出双侧颈总动脉,分离动脉鞘,暴露光滑颈总动脉,注意不要损伤迷走神经。在颈总动脉上放置 0.12 mm 的鱼线,4-0 号丝线结扎右侧颈总动脉,轻轻抽出鱼线。15 min 后同样方法结扎另一侧,逐层缝合皮肤。假手术对照组只单纯暴露双侧颈总动脉,不做结扎。

1.4 甲苯胺蓝灌注

分别取模型 0 h 组,假手术对照组的小鼠进行甲苯胺蓝灌注。腹腔注射 3.5%水合氯醛麻醉,开胸暴露心脏,经左心室插入升主动脉灌注生理盐水,后灌注 0.1%的甲苯胺蓝,断头取脑,-80 °C 冰箱冷冻后切片观察。

1.5 免疫组织化学染色

腹腔注射 3.5%水合氯醛麻醉,开胸暴露心脏。经左心室插入升主动脉灌注生理盐水。断头取脑,左侧保存-80 °C 冰箱,右侧 4%多聚甲醛固定 72 h。后经石蜡包埋,切片。切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,PBS 冲洗,枸橼酸钠抗原修复,PBS 冲洗,3% H₂O₂ 10 min 消除内源性过氧化物酶的影响。PBS 冲洗,滴加一抗(1:400)4 °C 过夜,PBS 冲洗,二抗 37 °C 2 h。常规脱水,透明,封片。光镜下观察。

1.6 免疫印迹法

取出-80 °C 保存标本,加裂解液冰上裂解,后经 BCA 法蛋白定量。50 μg 蛋白恒定上样量,电泳,转膜,一抗(1:1 000)4 °C 过夜,二抗 37 °C 2 h,显色。Quantity One 软件对蛋白条带半定量分析结果。

1.7 统计学处理

本实验采用 IPP 6.0 和 SPSS 17.0 统计软件分析实验数据,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,经过正态分布检验后对实验数据进行方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 甲苯胺蓝灌注

模型 0 h 组甲苯胺蓝灌注后发现大脑整体呈现苍白色,

冠状切后发现切面呈明显苍白色。而假手术对照组整体和各冠状切面都呈现深蓝色(图 1)。结果提示,此模型可以造成小鼠大脑血流量有效减少。

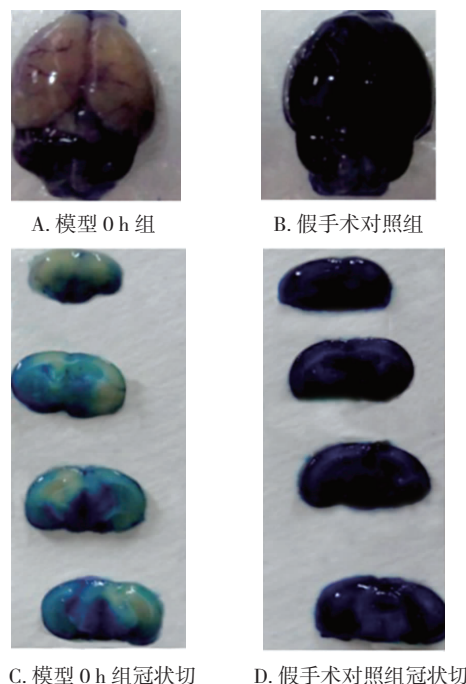


图 1 甲苯胺蓝灌注结果

Fig.1 Result of Anilin blue perfusion

2.2 胶质原纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein,GFAP)免疫组化结果

2.2.1 GFAP 免疫组化形态学改变 GFAP 染色发现,阳性细胞主要分布在海马区域。与假手术对照组相比(图 2A),模型各组星形胶质细胞数量增多,突起变长,变粗,分支增多,胞体肿胀,肥大。有的星形胶质细胞甚至重叠到一起,突起交叉。GFAP 染色加深,从模型 4 个月组开始,有类似胶质疤痕结构出现(图 2D,2F)。

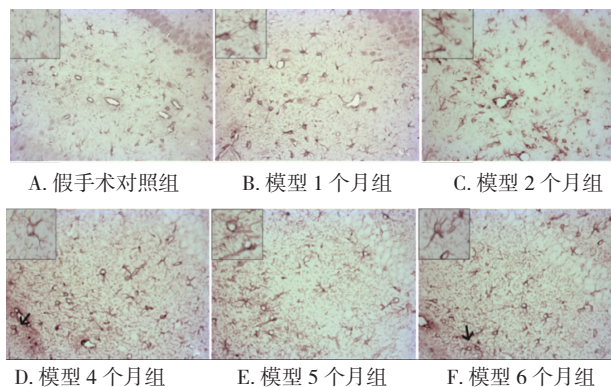


图 D、E 中箭头所指可见星形胶质细胞交叠,小框内可见星形胶质细胞胞体和突起变化

图 2 GFAP 在小鼠海马 CA1 区免疫组化染色结果(400 ×)

Fig.2 Immunohistochemical staining of GFAP in hippocampus CA1 (400 ×)

2.2.2 对 GFAP 免疫组化阳性细胞数量统计学分析 每组切片随机选取海马区 5 个不重叠高倍视野,对 GFAP 阳性细胞计数。不同组别脑内 GFAP 阳性细胞数量不全相同($F=149.192, P=0.000$),通过 LSD- t 法两两比较发现,与假手术对照组相比,从模型 2 个月组开始阳性细胞数明显增加,一直持续到模型 6 个月组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 慢性脑缺血对小鼠脑内 GFAP 阳性细胞数影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.1 Number of astrocytes after chronic cerebral hypoperfusion in mice brain ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	GFAP阳性细胞数
假手术对照组	25.8 ± 2.1
模型 1 个月组	29.4 ± 1.1^b
模型 2 个月组	39.6 ± 1.1^{ab}
模型 4 个月组	56.6 ± 2.9^{ab}
模型 5 个月组	59.4 ± 3.9^{ab}
模型 6 个月组	64.0 ± 4.8^a

注:不同组别脑内 GFAP 阳性细胞数量不全相同 ($F=149.192, P=0.000$);模型各组与假手术对照组相比, $a, P=0.000$;模型 6 个月组与模型 1、2、4、5 个月组相比, $b, P<0.05, P$ 值分别为 0.000, 0.000, 0.001, 0.023

2.2.3 对 GFAP 免疫组化累计光密度(integrated option density, IOD)值统计学分析 不同组别脑内 GFAP 的 IOD 值不全相同($F=20.051, P=0.000$),与假手术对照组相比,模型 2、4、5、6 个月组 IOD 明显增高,且差异具有统计学意义(P 值分别为 0.006、0.000、0.000、0.000),模型 6 个月组与模型 1、2、4、5

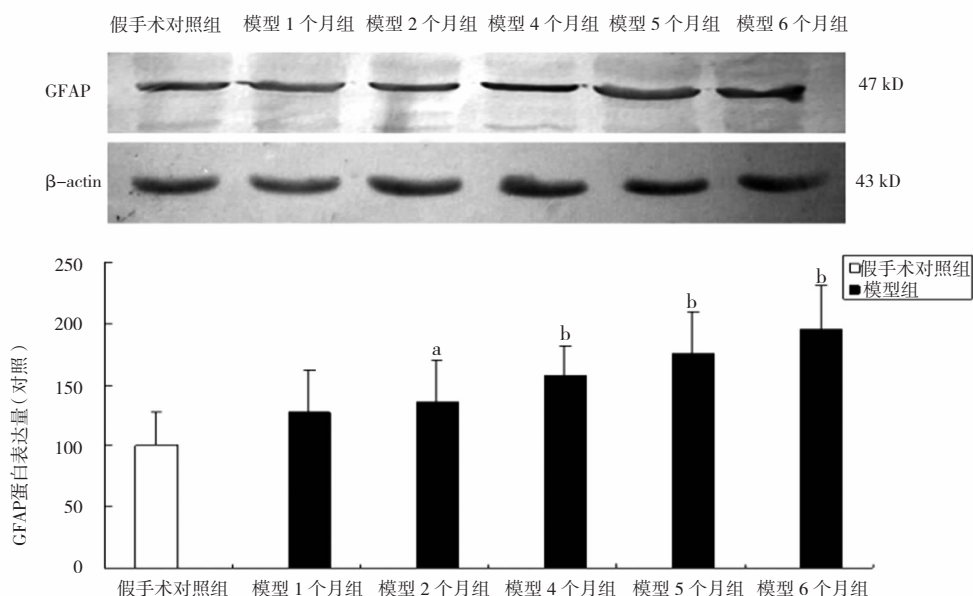
个月组相比较,IOD 值最高,且差异具有统计学意义(P 值分别为 0.000、0.000、0.003、0.036)。

2.3 免疫印迹

不同组别脑内 GFAP 含量不全相同($F=15.641, P=0.000$),LSD- t 两两比较发现,与假手术对照组相比,模型 2、4、5、6 个月组脑内 GFAP 蛋白表达量进行性增高,且具有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 3。

3 讨论

慢性脑缺血模型中最常用的是 2 VO,最早由 De la Torre 等^[4]建立,一般用于大鼠。而大脑中动脉栓塞模型,并不能造成全脑缺血,多用于短期局灶性脑缺血再灌注研究。目前国内做小鼠长期脑缺血的研究比较少见。在笔者前期实验摸索中采用 2 VO 方法,由于小鼠耐受力较差,死亡率较高。因此,参照 Shibata 等^[5]的双侧颈总动脉狭窄法,采用改良 2 VO 模型。甲苯胺蓝灌注发现,模型 0 h 组大脑整体和冠状切面呈苍白色,而假手术对照组呈深蓝色,提示此模型能够造成有效脑缺血。可见改良的 2 VO 是一种良好的慢性脑缺血模型制作方法。本实验选用 C57 小鼠制作慢性脑缺血模型,为以后采用转基因小鼠提供良好依据,有利于把脑缺血与转基因模型结合起来,为后期研究家族性 AD 和散发性 AD



不同组别脑内 GFAP 含量不全相同 ($F=15.641, P=0.000$);与假手术对照组相比, $a, P<0.05, b, P<0.01$,从模型 1 个月组到模型 6 个月组 P 值分别为 0.052、0.018、0.000、0.000、0.000;模型 6 个月组与模型 1、2、4、5 个月组相比, P 值分别为 0.000、0.000、0.001、0.037

图 3 慢性脑缺血不同时间段小鼠脑内 GFAP 含量变化

Fig.3 Expression of glial fibrillary acidic protein in mice brain after chronic cerebral hypoperfusion

模型打下基础。

慢性脑缺血在 AD、VD、皮下动脉硬化性脑病等神经退行性疾病的发生发展中起着重要作用。慢性脑缺血可造成以弥漫性脱髓鞘和胶质细胞增生为特点的脑白质损伤^[5]。诸如高血压,动脉粥样硬化等都是慢性脑缺血的危险因素。这些危险因素的最终结果都是损害神经元和神经胶质细胞^[6]。

星形胶质细胞是胶质细胞中最多种的一种。具有对神经元的营养保护修复作用,调节神经细胞内外离子浓度,维持体液平衡,参与构成血脑屏障,突触可塑性,并与神经元双向调控脑血流量等多种生物学功能^[7-10]。缺血性脑损伤时,星形胶质细胞可被激活并释放包括白介素,肿瘤坏死因子,生长因子等一系列细胞因子,通过经典途径激活补体,介导早期的炎症反应^[11]。星形胶质细胞激活后,发生形态和数量的变化,胞体增大,周围突起增多,变粗,GFAP 表达增强,并可出现不同程度的重叠,即反应性星形胶质细胞。如果损伤严重甚至形成胶质疤痕^[12-14]。

本研究发现,从模型 2 个月组开始,出现明显的星形胶质细胞数量增多,GFAP 染色光密度增强,IOD 值增高,脑内 GFAP 蛋白表达量增高,且这种变化一直持续,在模型 6 个月组达到高峰。模型 4 个月组后,免疫染色发现类似胶质疤痕结构,它能明显抑制轴突再生和炎症反应,可能参与慢性脑缺血进行性发展,最终造成不可逆损伤。通过观察慢性脑缺血后脑内星形胶质细胞的动态变化,发现缺血后星形胶质细胞出现持续性增生,可能与各种慢性脑缺血病情持续性恶化有关。在后续的研究中我们会继续关注星形胶质细胞的变化,以及与阿尔茨海默病相关其他指标变化,并把慢性脑缺血与转基因小鼠联系起来,探讨慢性脑缺血与 AD 的关系。

一直以来,大家关注的都是反应性星形胶质细胞的负面作用。胶质疤痕的形成抑制轴突再生,对神经功能恢复起阻碍作用。但近年来发现,反应性胶质细胞有一定的正面作用,比如:修复血脑屏障,保护和修复受损神经元,降解 β -淀粉样肽,减少创伤后的血管性水肿,产生保护性的谷胱甘肽,限制炎性细胞蔓延,控制感染等^[15-19]。本实验发现模型 4 个月组开始,出现胶质疤痕,此时脑低灌注的状态可能有所代偿,但持续性损伤造成的脑内病理改变已不可逆转。故模型 4 个月组前即胶质疤痕产生前如果给予相应的治疗措施,并充分利用反应性星形

胶质细胞的正面作用,可能阻止病变朝不可逆方向发展。所以观察星形胶质细胞变化为慢性脑缺血的治疗提供一个新的切入点,但其中的机制还需进一步探讨研究。尽管很多神经系统退行性疾病出现了反应性星形胶质细胞,在疾病的发生和发展中起着重要作用,但它的功能,作用以及分子机制在很大程度上还是不确定。因此,研究反应性星形胶质细胞很可能为神经系统疾病的治疗提供新的靶标。

参 考 文 献

- [1] Jian H, Yi-Fang W, Qi L, et al. Cerebral blood flow and metabolic changes in hippocampal regions of a modified rat model with chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Acta Neurol Belg*, 2012, doi:10.1007/s13760-012-0154-6 [Epub ahead of print].
- [2] Kitaguchi H, Tomimoto H, Ihara M, et al. Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid beta deposition in APPSwInd transgenic mice[J]. *Brain Res*, 2009, 1294:202-210.
- [3] Panickar KS, Norenberg MD. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations[J]. *Glia*, 2005, 50(4):287-298.
- [4] De la Torre JC, Fortin T, Park GA, et al. Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats[J]. *Brain Res*, 1992, 582(2):186-195.
- [5] Shibata M, Ohtani R, Ihara M, et al. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Stroke*, 2004, 35(11):2598-2603.
- [6] De la Torre JC. Cerebral hemodynamics and vascular risk factors: setting the stage for Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 32(3):553-567.
- [7] Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, et al. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update[J]. *Glia*, 2007, 55(12):1251-1262.
- [8] Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information[J]. *Trends Neurosci*, 2009, 32(8):421-431.
- [9] Oberheim NA, Wang X, Goldman S, et al. Astrocytic complexity distinguishes the human brain[J]. *Trends Neurosci*, 2006, 29(10):547-553.
- [10] Carmignoto G, Gómez-Gonzalo M. The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling[J]. *Brain Res Rev*, 2010, 63(1-2):138-148.
- [11] Veerhuis R, Janssen I, De Groot CJ, et al. Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor[J]. *Exp Neurol*, 1999, 160(1):289-299.
- [12] Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis[J]. *Glia*, 2005, 50(4):427-434.
- [13] Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease[J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006, 2(12):679-

神经疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.2014.02.003

姜黄素对 APP^{swe}/PSEN1dE9 双转基因小鼠海马神经元 SR-B I 和 ABCA1 表达的影响

孙洁芸, 李 丹, 滕志朋, 田茗源, 张 雄, 李 昱

(重庆医科大学神经科学中心、重庆市神经生物学重点实验室、重庆医科大学基础医学院病理教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察姜黄素对 β -淀粉样前体蛋白 swe 基因/早老蛋白 1dE9 基因 (APP^{swe}/PSEN1dE9) 双转基因小鼠海马神经元 B 类 I 型清道夫受体 (scavenger receptor class B type I, SR-B I) 和三磷酸腺苷结合盒 A1 (ATP-binding cassette transporter, ABCA1) 表达的影响, 探讨姜黄素在阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 防治中的机制。**方法:**将 10 只 6 月龄的 APP^{swe}/PSEN1dE9 双转基因小鼠随机分为对照组和姜黄素饲喂组, 每组 5 只。姜黄素饲喂组每天饲喂 500 ppm 姜黄素, 6 个月后采用免疫组化法检测小鼠海马神经元 SR-B I 和 ABCA1 表达的变化。**结果:**与对照组相比, 姜黄素饲喂组小鼠海马神经元 ABCA1 表达明显增加 ($t=-10.805, P=0.000$), 但 2 组小鼠海马神经元中均未见 SR-B I 表达。**结论:**姜黄素能提高 APP^{swe}/PSEN1dE9 双转基因小鼠海马神经元 ABCA1 的表达, 而 SR-B I 在神经元中未见表达。

【关键词】姜黄素; β -淀粉样前体蛋白 swe 基因/早老蛋白 1dE9 基因双转基因小鼠; 海马; B 类 I 型清道夫受体; 三磷酸腺苷结合盒 A1

【中图分类号】R282.71; R749.1⁺6; R965**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-02-27Effects of curcumin on the expression of SR-B I and ABCA1 in neurons of hippocampus of APP^{swe}/PSEN1dE9 double transgenic mice

Sun Jieyun, Li Dan, Teng Zhipeng, Tian Mingyuan, Zhang Xiong, Li Yu

(Institute of Neuroscience, Chongqing Key Laboratory of Neurobiology, Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the effect of curcumin on expression of scavenger receptor class B type I (SR-B I) and ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) in neurons of hippocampus of APP^{swe}/PSEN1dE9 double transgenic mice and to investigate the mechanism of curcumin in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. **Methods:** Ten six-month-old APP^{swe}/PSEN1dE9 double transgenic mice were randomly divided into control group and curcumin group. Each group had 5 mice. Mice in curcumin group were fed curcumin 500 ppm every day. Six months later, changes of the expression of SR-B I and ABCA1 in neurons of hippocampus

作者介绍: 孙洁芸, Email: 183803433@qq.com,

研究方向: 神经病理学。

通信作者: 李 昱, Email: liyu100@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81271426、30973154、81100948)。

were detected by immunohistochemistry. **Results:** Expression of ABCA1 in neurons of hippocampus of mice in curcumin group was increased significantly compared with that of control group ($t=-10.805, P=0.000$) while expression of SR-B I was not detected in both groups. **Conclusions:** Curcumin can induce expres-

689.

[14] Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection [J]. *Neuroscientist*, 2005, 11(5): 400-407.

[15] Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice [J]. *Neuron*, 1999, 23(2): 297-308.

[16] Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, et al. Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial

amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(50): 13574-13581.

[17] Koistinaho M, Lin S, Wu X, et al. Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid- β peptides [J]. *Nat Med*, 2004, 10(7): 719-726.

[18] Zador Z, Stiver S, Wang V, et al. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(190): 159-170.

[19] Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. Astrocyte influences on ischemic neuronal death [J]. *Curr Mol Med*, 2004, 4(2): 193-205.

(责任编辑: 唐秋姗)