

神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000574

丙戊酸钠对 APP/PS1 双转基因小鼠脑内星形胶质细胞和神经营养因子的影响

龙志敏, 赵 蕾, 贺桂琼

(重庆医科大学神经科学中心、重庆医科大学基础医学院人体解剖学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察丙戊酸钠(valproic acid sodium salt, VPA)对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型小鼠脑内星形胶质细胞、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)的影响。**方法:**取 3 月龄的 APP/PS1 双转基因小鼠 AD 模型小鼠 24 只,按随机数字表法平均分为治疗组和对照组。VPA 治疗组小鼠腹腔注射 VPA 30 mg/(kg·d),对照组小鼠腹腔注射等量生理盐水,采用免疫组化法观察 2 组小鼠皮质和海马区星形胶质细胞数量的变化,Western blot 检测 2 组小鼠皮质和海马 BDNF 和 GDNF 的表达水平。**结果:**与对照组比较,VPA 治疗组小鼠皮质和海马区星形胶质细胞标志物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的阳性细胞数量均明显减少($t=5.476, 8.793, P$ 均=0.000),BDNF 和 GDNF 表达水平均明显升高($t=4.303, P=0.001; t=2.376, P=0.032$)。**结论:**VPA 可抑制星形胶质细胞增生,提高神经营养因子的表达水平。

【关键词】阿尔茨海默病;丙戊酸钠;星形胶质细胞;神经营养因子

【中图分类号】R394.3;R741.05

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-11-19

Effect of valproic acid on astrocyte and neurotrophic factors in APP/PS1 double transgenic mice

Long Zhimin, Zhao Lei, He Guiqiong

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

【Abstract】Objective: To investigate the effect of valproic acid sodium salt(VPA) on astrocyte and neurotrophic factors in the brain of APP/PS1 double transgenic mice. **Methods:** Alzheimer's disease(AD) model was established with APP/PS1 double transgenic mice. Twenty-four mice(3-month-old) were randomly divided into a VPA group and a control group. The mice of VPA group and control group were intra peritoneally injected with VPA 30 mg/(kg·d) and the same amount of normal saline for 4 weeks. Immunohistochemistry staining was applied to detect the number of astrocytes, while Western blot was used to observe the expression of brain-derived neurotrophic factor(BDNF) and glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF). **Results:** Compared with those of control group, the number of positive cells of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein(GFAP) in the cortex and hippocampus of VPA treatment mice was significantly reduced($t=5.476, 8.793, P<0.001$) and the expression levels of BDNF and GDNF were significantly increased($t=4.303, P=0.001; t=2.376, P=0.032$). **Conclusion:** VPA can inhibit the proliferation of astrocytes, enhance the expression of neurotrophic factors.

【Key words】Alzheimer's disease; valproic acid; astrocyte; neurotrophic factor

作者介绍:龙志敏, Email: zhiminlong@163.com,

研究方向:阿尔茨海默病的发病机制及治疗。

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, 81371221);

教育部“新世纪优秀人才支持计划”资助项目(编号:NCET-11-1084)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150320.2143.005.html>

(2015-03-20)

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是发生于老年和老年前期、以进行性认知功能障碍和行为损害为特征的中枢神经系统退行性病变。其典型病理特征为神经细胞外 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)沉积形成的老年斑、神经细胞内 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经元纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)及神经元和突触的丢失^[1]。近年来研究发现, AD 患者脑内星型胶质细胞明显活化, 可导致 A β 产生增多、清除减少, 活化的星型胶质细胞释放炎症因子, 并引起能量代谢障碍, 导致 AD 的进一步发生、发展^[2-4]; 但同时星型胶质细胞又可以通过分泌多种神经营养因子减轻 AD 症状^[5]。当神经元出现损伤和病变时, 神经营养因子具有保护其存活和促进其再生的作用。本课题前期研究发现, 丙戊酸钠(valproic acid sodium salt, VPA), 这种广泛运用于临床的双向情感抑制剂, 对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠具有神经保护作用^[6-8]。本研究通过观察 VPA 对 APP/PS1 双转基因小鼠星形胶质细胞以及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)的影响, 探讨 VPA 治疗 AD 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠 B6C3-Tg(APP^{swe}, PSEN1^{de9})购自中国医学科学院实验动物研究所, 饲养于重庆医科大学动物实验中心 SPF 级动物房, 自由摄食和饮水。

1.2 实验试剂

鼠抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein, GFAP)单克隆抗体购于美国 CST 公司; 兔抗 BDNF、GDNF 多克隆抗体购于博奥森公司; 鼠抗 β -actin 单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司; 羊抗兔和羊抗小鼠 IgG 二抗购自美国 Jackson ImmunoResearch Laboratories; 组织蛋白裂解液、DAB 试剂盒购于美国 Pierce 公司; ABC 免疫组化试剂盒购自北京中杉公司; BCA 试剂盒、显影定影液购于碧云天。其他均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及药物处理 初取 3 月龄 APP/PS1 小鼠 24 只, 按随机数字表法分为 VPA 治疗组和对照组, 每组 12 只。VPA 组小鼠腹腔注射 VPA 30 mg/(kg·d)进行治疗, 对照组腹腔注射等量生理盐水, 持续用药 4 周。每天固定给药时间和操作人员, 并记录小鼠体质量及行为活动。所有操作遵循

重庆医科大学实验动物使用伦理要求。用药结束后行 Morris 水迷宫实验检测各组小鼠的空间学习记忆能力, 方法参考文献[8]。根据行为学实验结果, 分别排除治疗组和对照组空间学习记忆能力最好的 1 只小鼠和最差的 2 只小鼠, 后续实验中共纳入 18 只小鼠进行分析, 每组各 9 只。

1.3.2 免疫组织化学检测 用药 4 周后, 采用 2%水合氯醛将小鼠麻醉, 经左心室快速灌注生理盐水 20 ml, 冰上取脑, 置于 4%多聚甲醛中后固定 72 h, 70%酒精常规脱水, 石蜡包埋, 冠状切片(厚度 4 μ m)。甲苯脱蜡后进行常规水化, 抗原修复后, 用 3% H₂O₂ 用于封闭内源性过氧化物酶的活性, 加入 I 抗(兔抗 GFAP 抗体, 浓度 1:400), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 再加入 II 抗复合物, 含镍 DAB 显色、封片后光镜下观察。阴性对照用 PBS 代替 I 抗孵育。用 Image Pro Plus 6.0 软件对免疫阳性细胞进行分析, 每组随机检测 5 只小鼠, 每只小鼠海马和皮质取相同区域 400 倍视野下分别计数 5 个视野的阳性细胞的数量。

1.3.3 Western blot 印迹检测 严格按照 Thermo scientific 公司提供的蛋白提取试剂盒说明, 提取小鼠脑组织中的蛋白质, 冰上操作, 玻璃匀浆器匀浆至完全裂解。采用 BCA 法进行蛋白浓度测量。取 50 μ g 总蛋白经 100 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 而后用 10% SDS PAGE 凝胶进行电泳, 分离出的凝胶条带, 用恒流 250 mA, 在 4 $^{\circ}$ C 下电转 2 h, 将目的蛋白转移至 PVDF 膜上, 5%脱脂牛奶液中室温封闭 2 h, 加入兔抗 BDNF、GDNF 抗体(浓度均为 1:1 000)和鼠抗 β -actin 抗体(浓度为 1:400), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗涤后加入 HRP 标记的二抗(15 000)室温孵育 2 h 后, 采用化学增强发光法(ECL)显色并制作成胶片后进行扫描, Quantity One 软件对蛋白条带进行光密度计量学分析, 并计算目的蛋白的相对表达量, 计算公式为: 目的蛋白光密度值/ β -actin 光密度值 $\times$ 100%。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 实验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 Levene 检验检测方差齐性, 正态分布资料组间比较采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 VPA 对 APP/PS1 小鼠脑内星形胶质细胞数量的影响

免疫组织化学染色显示 2 组小鼠皮质及海马区星形胶质细胞标志物 GFAP 均广泛表达(图 1)。其中, VPA 治疗组 APP/PS1 小鼠皮质区 GFAP 的阳性细胞数量为(63.36 ± 6.46)个, 对照组小鼠皮质区为(74.08 ± 7.35)个, VPA 治疗组小鼠皮质区 GFAP 的阳性细胞数较对照组明显减少, 差异有统计学意义($t=5.476, P=0.000$); 而 VPA 治疗组小鼠海马区 GFAP 的阳性细胞数量为(30.92 ± 5.66)个, 也少于对照组的(43.60 ± 4.72)个, 2 组比较差异有统计学意义($t=8.793, P=0.000$)。

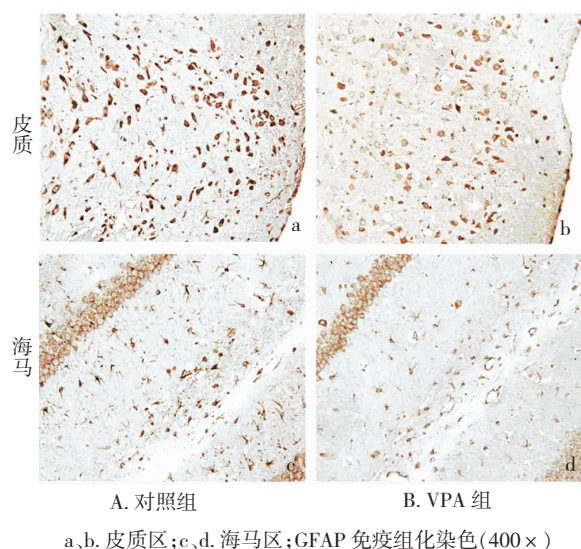


图 1 对照组和 VPA 组小鼠皮质和海马区星形胶质细胞比较
Fig.1 Number of astrocytes in cortex and hippocampus of control group and VPA group

2.2 对照组和 VPA 组 APP/PS1 小鼠脑内 BDNF 蛋白的表达

Western blot 检测显示:VPA 治疗组 APP/PS1 小鼠脑内 BDNF 蛋白的相对表达量为 (116.33 ± 15.31) ,对照组为 (79.46 ± 18.78) ,VPA 治疗组小鼠脑内 BDNF 蛋白的表达高于对照组(图 2),差异有统计学意义($t=4.303, P=0.001, n=8$)。

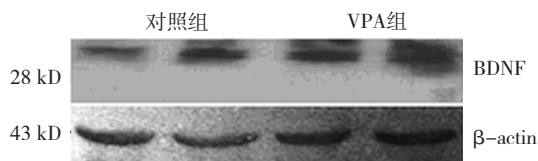


图 2 Western blot 检测显示对照组和 VPA 组 APP/PS1 小鼠脑内 BDNF 蛋白表达水平
Fig.2 Western blot showing the expression of BDNF protein in the brain of control group and VPA group APP/PS1 mice

2.3 对照组和 VPA 组 APP/PS1 小鼠脑内 GDNF 蛋白的表达

Western blot 检测显示:VPA 治疗组 APP/PS1 小鼠脑内 GDNF 蛋白的相对表达量为 (107.75 ± 11.97) ,对照组为 (88.89 ± 19.00) ,VPA 治疗组小鼠脑内 GDNF 蛋白的表达也高于对照组(图 3),差异有统计学意义($t=2.376, P=0.032, n=8$)。

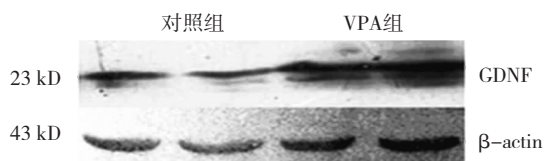


图 3 Western blot 检测显示对照组和 VPA 组 APP/PS1 小鼠脑内 GDNF 蛋白表达水平
Fig.3 Western blot showing the expression of GDNF protein in the brain of control group and VPA group APP/PS1 mice

3 讨论

AD 是一种发病机制复杂的神经退行性疾病。目前 AD 的临床治疗药物多属于单靶向化合物,大多只是针对 AD 的相关症状,但并不能扭转病情,治疗没有特异性^[1]。近年来研究发现,VPA 不仅作为抗癫痫药物和情绪稳定剂在临床上广泛应用,还表现出多种神经保护和神经诱导作用^[9]。本课题前期研究结果表明,VPA 可以改善 4 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠的空间学习记忆能力,减少 A β 的产生和老年斑的形成,抑制凋亡的发生,减少神经元的丢失^[6-8]。

在中枢神经系统中,神经胶质细胞的数量远远多于神经元,大约是神经元的 10~50 倍。其中星形胶质细胞是胶质细胞中体积最大的一种,占胶质细胞的 30%~40%,主要对神经元提供营养支持保护,并参与血脑屏障形成和免疫功能,在维持神经元能量稳态方面具有极为重要的作用。近年来,星形胶质细胞在 AD 发病中的重要作用越来越受到关注。研究发现,星形胶质细胞可通过多种机制影响 AD 病理过程。Angelova 和 Abramov^[10]认为 AD 脑内 A β 的沉积激活了星形胶质细胞,促使它们释放炎症蛋白使 A β 进一步聚集形成不溶性的具有神经毒性的沉淀;星形胶质细胞激活后释放大量炎症介质,导致 AD 神经炎症的发生;星形胶质细胞活化诱导活性氧介质生成增加,引发 AD 脑内氧化应激损伤神经元^[11-12];星形胶质细胞释放增加的白细胞介素-1 不仅能使淀粉前体蛋白表达上调,还能加速神经原纤维缠结形成,并且可以再次激活星形胶质细胞,导致 AD 发病进程呈级联反应^[13]。然而,VPA 对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠脑内的星形胶质细胞的影响尚不明确。本研究结果发现,长期注射 VPA 可以减少 AD 模型鼠脑内激活的星形胶质细胞数量,这可能是 VPA 减少 APP/PS1 双转基因小鼠脑内 A β 并发挥神经保护作用的原因之一。

神经营养因子是一类由神经所支配的组织 and 星形胶质细胞产生的且为神经元生长与存活所必需的蛋白质分子。BDNF 和 GDNF 是神经元和神经胶质细胞重要的神经营养因子。BDNF 能促进多种神经元的存活和生长发育,减少损伤后神经元凋亡,还能提高突触可塑性,改变脑内神经元的形态,促进轴突和树突的生长。因此,Bramham 和 Messaoudi^[14]

认为 BDNF 是记忆形成过程中的关键蛋白之一。在 AD 的发病过程中,由于淀粉样蛋白、神经元丢失等作用可能导致了 BDNF 的功能及表达的降低,而 BDNF 功能的降低和数量的变少又进一步加重了 AD 患者神经元的凋亡丢失及淀粉样蛋白沉积,产生神经毒性作用,降低突触可塑性,进而影响长时程增强,最终加重学习、记忆以及认知方面的障碍,形成了恶性循环^[15-16]。GDNF 是神经营养因子家族中的主要成员之一,存在于多种相互关联的信号传导通路,能够促进发育中神经元的存活、分化及正确迁移,对损伤后的神经细胞有保护和修复作用。

AD 发生早期,星形胶质细胞激活,产生的 BDNF、GDNF 会反应性表达增加,可以起到神经保护作用^[15,17]。VPA 减少了 AD 模型鼠脑内过度激活的星形胶质细胞数量,是否也会因此减少胶质细胞产生的神经营养因子呢? 本研究结果显示,VPA 治疗后,APP/PS1 小鼠脑内 BDNF 和 GDNF 蛋白水平并没有因为星形胶质细胞减少而降低,反而升高。由于神经元和神经所支配的组织是产生神经营养因子的重要来源,故本研究推测,BDNF 和 GDNF 蛋白水平升高可能与 VPA 减少了神经元的丢失有关。

综上所述,本研究结果表明,长期注射 VPA 可以减少 AD 模型小鼠脑内激活的星形胶质细胞数量,升高 BDNF 和 GDNF 蛋白水平。此外,由于 BDNF、GDNF 等神经营养因子不易穿过血脑屏障,难以直接应用于 AD 的临床治疗。因此,本研究为 VPA 治疗 AD 进一步提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer disease[J]. Dis Mon, 2010, 56(9): 484-546.
- [2] Garwood CJ, Pooler AM, Atherton J, et al. Astrocytes are important mediators of A β -induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture[J]. Cell Death Dis, 2011, 2(6): e167.
- [3] Racchetti G, D' Alessandro R, Meldolesi J. Astrocyte stellation, a process dependent on Rac1 is sustained by the regulated exocytosis of enlargosomes[J]. Glia, 2012, 60(3): 465-475.
- [4] Yan LJ, Xiao M, Chen R, et al. Metabolic dysfunction of astrocyte: an initiating factor in beta-amyloid pathology? [J]. Aging Neurodegener, 2013, 1(1): 7-14.
- [5] Kimura N, Takahashi M, Tashiro T, et al. Amyloid beta up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid-beta-related neuritic degeneration[J]. J Neurosci Res, 2006, 84(4): 782-789.
- [6] Qing H, He G, Ly PT, et al. Valproic acid inhibits A β production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models[J]. J Exp Med, 2008, 205(12): 2781-2789.
- [7] Long Z, Zheng M, Zhao L, et al. Valproic acid attenuates neuronal loss in the brain of APP/PS1 double transgenic Alzheimer's disease mice model[J]. Curr Alzheimer Res, 2013, 10(6): 263-269.
- [8] 龙志敏, 赵 蕾, 姜 蓉, 等. 丙戊酸钠对雌雄 APP/PS1 双重转基因小鼠行为学及老年斑的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2011, 20(3): 205-207.
- [9] Chi-Tso Chiu, Zhifei Wang, Joshua G, et al. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder [J]. Pharmacol Rev, 2013, 65(1): 105-142.
- [10] Angelova PR, Abramov AY. Interaction of neurons and astrocytes underlies the mechanism of A β -induced neurotoxicity[J]. Biochem Soc Trans, 2014, 42(5): 1286-1290.
- [11] Merlino M, Meyer EP, Ulmann-Schuler A, et al. Vascular β -amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcA β mice[J]. Acta Neuropathol, 2011, 122(3): 293-311.
- [12] Jung ES, An K, Hong HS, et al. Astrocyte-originated ATP protects A β (1-42)-induced impairment of synaptic plasticity[J]. J Neurosci, 2012, 32(9): 3081-3087.
- [13] Zhao J, O'Connor T, Vassar R. The contribution of activated astrocytes to A β production: implications for Alzheimer's disease pathogenesis[J]. J Neuroinflammation, 2011(8): 150.
- [14] Bramham CR, Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis[J]. Prog Neurobiol, 2005, 76(2): 99-125.
- [15] Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, et al. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function[J]. Front Neuroendocrinol, 2004, 25(2): 77-107.
- [16] Ji Y, Lu Y, Yang F, et al. Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons[J]. Nat Neurosci, 2010, 13(3): 302-309.
- [17] Straten G, Saur R, Laske C, et al. Influence of lithium treatment on GDNF serum and CSF concentrations in patients with early Alzheimer's disease[J]. Curr Alzheimer Res, 2011, 8(8): 853-859.

(责任编辑: 关蕴良)