

丁苯酞对阿尔茨海默病模型大鼠 NeuN、IL-1 的影响

侯德仁 唐交春 严文广 孙娟娟 周 军

摘 要 **目的** 研究阿尔茨海默病(AD)模型大鼠海马中神经元核抗原(NeuN)、白细胞介素 1(IL-1)的表达及丁苯酞对其影响。**方法** 成年雄性 SD 大鼠 60 只,随机分为模型组、丁苯酞组及对照组,每组 20 只,采用立体定位仪向左侧海马微量注射 β 淀粉样蛋白 1-42(A β 1-42)的方法建立 AD 大鼠模型,通过 Y-形电迷宫检测造模前及造模后 60 天大鼠的学习记忆能力;喂养 60 天以后取各组大鼠脑组织,进行 NeuN 和 IL-1 免疫组织化学染色。**结果** 与对照组相比,模型组大鼠学习记忆能力下降,其海马各区 NeuN 阳性细胞明显减少,IL-1 表达增多,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,丁苯酞组大鼠学习记忆能力有所改善,其海马各区 NeuN 阳性细胞明显增多,IL-1 表达减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 丁苯酞能够改善 AD 大鼠的学习记忆能力,可能与抑制 IL-1 的表达、减少对神经细胞的损伤有关。

关键词 丁苯酞 阿尔茨海默病 神经元核抗原 白介素-1

Effect of Butylphthalide on Expression of NeuN and IL-1 in Model Rats with Alzheimer disease. Hou Deren, Tang Jiaochun, Yan Wenguang, Sun Juanjuan, Zhou Jun. Department of Neurology, Third Xiangya Hospital, Central South University, Hunan 410013, China

Abstract Objective To determine the expression of neuronal nuclei(NeuN) in the CA1 region of hippocampus and Interleukin-1(IL-1) in the junction of cortex and CA1 region of hippocampus in model rats with Alzheimer disease (AD), and to determine the effect of butylphthalide on them and its significance. **Methods** Sixty male adult rats were randomly divided into a model group, a butylphthalide group, and a control group. AD models were established by injecting beta-amyloid protein 1-42(A β 1-42) into the hippocampus of rats. The learning and memory ability were evaluated by Y-type electric maze before and sixty days later. The rats were sacrificed and both sides of the hippocampus were sectioned for immunohistochemistry. **Results** The learning and memory abilities reduced, positive cells of NeuN in the hippocampus of the model group decreased and the expression of IL-1 increased statistically, compared with the control group($P < 0.01$). The learning and memory abilities improved, the positive cells of NeuN in the hippocampus of the butylphthalide group increased and the expression of IL-1 decreased statistically, compared with the model group($P < 0.05$). **Conclusion**

Butylphthalide has an effect of improving learning and memory ability of AD model rats, which is possibly due to the reduce of the expressions of IL-1 and the protection of the nerve tissue.

Key words Alzheimer disease; Butylphthalide; NeuN; IL-1

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一种与衰老相关的中枢神经系统退行性变性疾病,发病机制复杂。很多学者认为,炎症可能在 AD 的发病及病情进展中起到重要作用。异常沉积的 A β 可能是炎症反应的激发因子, A β 异常沉积,促进了脑内炎症细胞的活化,这些细胞活化后产生的多种炎性产物介导了 AD 的整个病理损伤过程^[1,2]。因此,减少炎症细胞的激活、抑制炎症因子的过度表达,有可能成为治疗

AD 的有效方法。丁苯酞(butylphthalide, NBP),作为我国拥有自主知识产权的国家一类新药,在缺血性脑血管病的治疗方面已取得明显疗效^[3]。NBP 作用机制中的多个重要环节与 AD 的病理变化过程密切相关,由此推测 NBP 可能能够用于 AD 的治疗。本实验通过建立 AD 大鼠模型,观察丁苯酞对 AD 模型大鼠学习记忆能力的影响;观察 AD 模型大鼠神经元损伤相关指标神经元核抗原(neuronal nuclei, NeuN)和炎症相关指标白细胞介素 1(interleukin-1, IL-1)表达的影响,初步探讨炎症反应在 AD 中的作用以及 NBP 对其影响。

材料与方法

1. 动物与分组:健康成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体重 220~240g,由中南大学湘雅医学院实验动物中心提供,随机分为模型组、丁苯酞组、对照组 3 组,每组 20 只。

基金项目:湖南省自然科学基金资助项目(09JJ3058);湖南省科学技术厅科技计划项目(2009SK3175)

作者单位:410013 长沙,中南大学湘雅三医院神经内科(侯德仁、唐交春、孙娟娟);康复医学科(严文广);医学实验中心(周军)

通讯作者:严文广,电子信箱:yanwenguang2003@yahoo.com.cn

2. 主要试剂和仪器: A β 1-42 购自美国 SIGMA 公司, NeuN 抗体购自美国 Chemicon (Millipore) 公司, IL-1 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 所有二抗、ABC 和 DAB 试剂盒购自美国 VECTOR 公司。日本产 SN-3 型脑立体定位仪; 日本产 Nikon Eclipse 80i 显微镜。

3. 模型制备及脑组织切片的制备: 模型的制备过程及运用 Y 型电迷宫进行学习记忆能力测定的方法参见文献[4, 5]。模型组和丁苯酞组的制备过程相同, 对照组海马内注射等容积的生理盐水代替 A β 1-42。模型制备成功后各组大鼠均予以常规饮食及正常活动, 模型组与对照组予以食用麻油灌胃, 丁苯酞组灌胃液体改为丁苯酞溶液(将丁苯酞稀释在食用麻油中制成 8mg/ml 的丁苯酞溶液备用, 按 80mg/kg 的剂量进行灌胃)。均为 2 次/天, 每次 1ml/100g。模型建立后 60 天, 用 10% 水合氯醛(0.35mg/kg) 麻醉, 暴露心脏, 经左心室插管至升主动脉, 先灌注 0.9% 的生理盐水约 300ml, 然后予 4% 的多聚甲醛灌注约 30min(先快后慢), 迅速开颅取脑, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48h, 梯度乙醇脱水, 透明, 石蜡包埋, 冠状切片(厚约 5 μ m)。

4. 免疫组织化学法检测: 取脱蜡切片放入 PBS 缓冲液中, 经抗原修复 80℃ 存放 20min, PBS 缓冲液清洗 1 次(10min), 再入 30% H₂O₂(室温)5min, 以消除内源性过氧化物酶, 缓冲液清洗 2 次。置于 2% BSA 封闭液(NeuN 为羊血清, IL-1 为 10% 马血清)40min, 以减少非特异性反应。分别在 NeuN(1:1000)和 IL-1(1:100)抗体中 4℃ 孵育过夜, 次日 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 加相应的二抗(NeuN 为 1:150, IL-1 为 1:200)溶液, 室温孵育 1h, PBS 缓冲液洗涤 3 次后, 置生物素与卵白素结合(ABC)试剂盒配置的混合液中培育 1h。加入底物呈色反应剂 DAB。呈色反应后, 切片经逐级脱水并封片。

每只大鼠脑组织取 2 张不相邻区域切片, 每张切片在 200 倍下观察, 分别选取海马 CA1 区或皮质海马交界区共 5 个非重叠视野计数阳性细胞个数, 计算其平均值。并用 Nikon DS 高分辨率数码相机经 NIS-Elements AR 3.0 软件拍照。

5. 统计学处理: 采用 SPSS 13.0 for Windows 统计软件进行统计分析。描述性资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 计量资料经过齐性检验, 各组间比较采用单因素的方差分析(ANOVA); 事后组间两两比较采用最小显著差异 *t* 检验(LSD-*t* 检验)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠学习记忆能力的检测: 各组大鼠术前均行为正常, 反应灵敏, 正常进食。术后 1~2 天, 对照组大鼠恢复正常。其余两组大鼠均出现反应迟钝, 精神萎靡, 喜卧少动, 少食少饮。术后 1 周以后, 模型组大鼠仍反应迟钝, 觅食行为少; 丁苯酞组较模型组大鼠而言, 精神较好, 觅食行为较正常。

造模前和灌胃 60 天后, 分别用 Y 型电迷宫进行检测, 以大鼠正确逃避电刺激所需的电击次数表示其学习记忆能力, 所需次数越少, 说明大鼠的学习记忆能力越好; 反之, 所需次数越多, 说明其学习记忆能力越差。造模后 60 天, 与对照组比较, 模型组大鼠正确逃避电刺激所需次数增多, $P < 0.01$, 有统计学意义, 说明模型组学习记忆能力下降; 与模型组比较, 丁苯酞组大鼠正确逃避电刺激所需的电击次数减少, $P < 0.05$, 有统计学意义, 说明丁苯酞可改善 AD 大鼠的学习记忆能力(表 1)。

表 1 造模前后各组大鼠逃避电刺激所需次数即学习记忆能力的比较($\bar{x} \pm s$, $n = 20$, 次)

组别	造模前	造模后
模型	18.15 $\pm$ 2.87 *	25.25 $\pm$ 3.35 *
丁苯酞	18.30 $\pm$ 3.29 #	22.10 $\pm$ 3.19 #
对照	18.20 $\pm$ 2.78	18.60 $\pm$ 2.41

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

2. 各组大鼠海马 CA1 区 NeuN 的表达情况: NeuN 抗体是神经细胞特异性的抗体, 能使神经细胞核特异性着色。阳性着色可见于海马及皮质广泛区域的神经细胞, 胞核呈棕褐色。NeuN 在各组大鼠海马区的表达见图 1; 各组大鼠海马 CA1 区的 NeuN 阳性细胞数见表 2。与对照组相比, 模型组大鼠海马 CA1 区的阳性细胞数明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组相比, 丁苯酞组大鼠海马 CA1 区的阳性细胞数明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

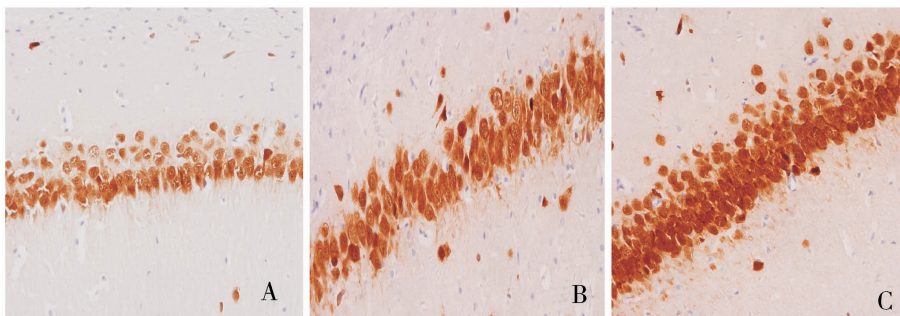


图 1 各组大鼠海马 CA1 区 NeuN 表达(HE, $\times 200$)

A. 模型组; B. 丁苯酞组; C. 对照组

表 2 各组大鼠海马 CA1 区 NeuN 阳性细胞个数($\bar{x} \pm s, n = 20, \text{个}$)

组别	NeuN 阳性细胞
模型	34.30 ± 4.96 [*]
丁苯酞	49.10 ± 5.08 [#]
对照	76.00 ± 6.51

与对照组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$

3. 各组大鼠皮质与海马 CA1 区交界处 IL-1 的

表达情况:IL-1 免疫组化阳性表达可见棕黄色免疫复合物沉积于小胶质细胞、星形胶质细胞内。IL-1 在各组大鼠皮质与海马 CA1 区交界处的表达见图 2; 各组大鼠海马皮质与海马 CA1 区交界处的 IL-1 阳性细胞数见表 3。与对照组相比,模型组大鼠皮质与海马 CA1 区交界处的阳性细胞数明显增多,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,丁苯酞组大鼠海马皮质与海马 CA1 区交界处的阳性细胞数明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

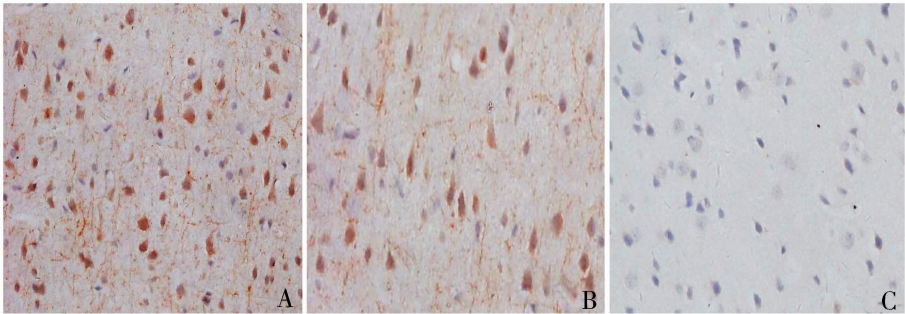


图 2 各组大鼠皮质与海马 CA1 区交界处 IL-1 表达 (HE, ×200)
A. 模型组; B. 丁苯酞组; C. 对照组

表 3 各组大鼠皮质与海马交界区 IL-1 阳性细胞个数($\bar{x} \pm s, n = 20, \text{个}$)

组别	IL-1 阳性细胞数
模型	42.35 ± 4.18 [*]
丁苯酞	29.40 ± 3.47 [#]
对照	5.95 ± 2.33

与对照组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$

讨 论

作为 AD 特征性的病理学改变之一,神经元的损伤与丢失与神经功能的缺失密切相关^[6]。减少神经元的损伤与丢失,将有利于改善 AD 患者的学习记忆能力、促进其神经功能的恢复。神经元核抗原(neuronal nuclei, NeuN)抗体是神经细胞特异性抗体,能使神经细胞核特异性着色。因此,NeuN 可以作为反映神经元损伤程度的指标。本实验采用左侧海马注射 A β 1-42 后,模型组大鼠出现了部分 AD 的行为学改变。Y 型电迷宫测试示:与造模前相比,造模后的模型组大鼠学会正确逃避电刺激所需电击次数明显增加,其学习记忆能力明显下降;造模后,与对照组比较,模型组大鼠逃避电刺激所需次数较多,学习记忆能力明显降低。免疫组化结果显示:较对照组而言,

模型组大鼠海马 CA1 区 NeuN 表达明显减少,且海马细胞排列紊乱,结构欠完整,可见大量锥体细胞的死亡。说明 AD 模型大鼠的神经细胞损伤相对严重,这可能与 A β 1-42 的神经毒性作用有关。结合本实验对各组大鼠学习记忆能力的研究结果可知,模型组神经细胞损伤严重,进而引起神经功能缺失,学习记忆能力下降。

近年来,许多研究表明,AD 是一种慢性炎症性疾病,即 AD 患者脑内持续存在着慢性炎症反应,而这种炎症反应,很有可能就是其他病理特征形成和发展的诱发因素^[7]。很多学者认为,A β 的异常沉积可能是 AD 病理过程的最初事件。在 A β 的刺激下,活化的 AS 和 MG 产生的白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)被认为是脑内神经炎症的始动环节^[8,9]。IL-1 在 AD 患者脑内的过度表达,并与 AD 的最主要神经病理改变的发生、发展直接相关。IL-1 可以促进 AS 或 MG 对其他细胞因子的表达,也可以诱导 NO、 β 前体样蛋白(β -APP)、补体、急性期蛋白、氧自由基、前列腺素等生成增加。这些分子作用于神经元或胶质细胞,促进其他炎性分子的产生^[8,9]。这些炎性因子可在胶质细胞、神经元和老年斑之间诱发炎症性级联反应,从而促成慢性炎症反应的形成和炎性

水平的持续升高,进而加重神经突和神经元的损伤、变性,甚至导致神经元死亡。在 AD 患者脑脊液中,IL-1 水平明显增高,对 AD 患者的皮质研究发现,IL-1 的脑内表达显著增多,且与 AD 的老年斑之同呈现强烈的相关性,提示 IL-1 参与了老年斑的形成^[10-13]。对 AD 患者的检查结果也证实,海马各区 IL-1 呈高表达,并认为它是介导 AD 脑内炎症性病理反应的关键性因子之一^[14,15]。本实验研究结果显示:造模后,与对照组相比,模型组大鼠皮质与海马 CA1 区交界处的 IL-1 表达明显增多,提示 AD 模型大鼠存在明显的炎症反应,并由此导致神经细胞损伤,进一步产生认知功能障碍,且炎症反应可能与 A β 1-42 的沉积有关。

丁苯酞在治疗缺血性脑血管病方面有着显著疗效^[3],其主要作用机制是改善脑组织的微循环、维护线粒体的结构和功能,抑制超氧阴离子自由基的形成,抑制神经细胞凋亡^[16-18]。此外,它还可以抑制缺血区的细胞间黏附分子-1、TNF- α 表达的升高,对 IL-1 和 TNF- α 等炎症因子所致的内皮细胞损伤具有保护作用,并能减少血脑屏障的破坏^[19-21]。本实验中,丁苯酞组大鼠海马 CA1 区 NeuN 表达较模型组明显增多,说明丁苯酞能够减轻神经元的损伤。丁苯酞组大鼠皮质与海马 CA1 区交界处 IL-1 表达也较模型组明显减少,说明丁苯酞能够抑制 IL-1 的表达,进而抑制炎症反应,减轻神经细胞的损伤,进而改善 AD 模型大鼠的学习记忆能力。由此笔者推测:丁苯酞可能通过改善脑组织的微循环、促进新生血管生成、加速微血管周围组织结构对 A β 等毒性物质的清除、减轻 A β 毒性、延缓胶质细胞的活化、抑制自由基的产生,进而减少 IL-1 的表达、抑制炎症反应,改善 AD 大鼠的学习记忆能力,这为进一步开发和寻找治疗 AD 的有效药物提供了新的思路。

参考文献

- Kamalvand G, Ali Khan Z. Immunolocalization of lipid peroxidation advanced glycation end products in amyloid A amyloidosis[J]. Free Radic Biol Med, 2004, 36(5): 657
- 罗晶. 星形胶质细胞在阿尔茨海默病中的作用. 实用医学杂志[J], 2008, 24(7): 1251-1252
- 崔丽英, 李舜伟, 吕传真, 等. 恩必普软胶囊治疗中度急性缺血性卒中的多中心开放临床研究[J]. 中国脑血管病杂志, 2005, 2(3): 112-115
- Hou D R, Wang Y, Zhou L, *et al.* Altered angiotensin converting enzyme and its effects on the brain in a rat model of Alzheimer disease [J]. Chin Med J(Ensl), 2008, 121(22): 2320-2323
- 侯德仁, 王艳, 薛俐, 等. 何首乌对 Alzheimer 病模型大鼠海马线粒体膜流动性、COX 活性的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2008, 33(11): 987-992
- Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease [J]. Nature, 2004, 430: 631-639
- 蔡志友, 晏勇, 晏宁, 等. 阿尔茨海默病患者血清中血管内皮生长因子和炎症因子相关性的研究[J]. 中国老年学杂志, 2008, 5(28): 998-999
- 陈艳. 王光楠, 金英. 小胶质细胞及其炎症因子参与阿尔茨海默病因果关系的研究[J]. 中国医药导报, 2008, 5(27): 16-18
- Hickman SE, Allison EK, El Khoury J. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice[J]. J Neurosci, 2008, 28(33): 8354
- 姚晶晶, 陈岚, 刘东戈. 炎症因子与阿尔茨海默病发病关系. 中国神经免疫学和神经病学杂志[J]. 2008, 5(15): 218-220
- Griffin WS. Inflammation and neurodegenerative disease [J]. Am J Clin Nutr. 2006, 83: 470-474
- Streit WJ. Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis [J]. J Neurosci Res, 2004, 77(1): 1-8
- Sheng JG, Zhu SG, Jones RA, *et al.* Interleukin-1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau proteins in vivo [J]. Exp Neurol, 2000, 163(2): 388-391
- Weisman D, Hakimian E, Ho GJ, *et al.* Interleukins, Inflammation, and Mechanisms of Alzheimer's disease [J]. Vitam Horm, 2006, 74: 505-530
- Mrak RE, Griffin WS. Potential inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis. 2005, 8: 369-375
- 鄢学芬, 詹瑾, 黄叶宁, 等. 丁苯酞的药理作用与临床评价[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(17): 1498-1500
- 谢瑛, 靳守华, 周国平, 等. dl-3-正丁基苯酞软胶囊治疗轻中度急性缺血性脑卒中的开放临床研究[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2006, 6(3): 178-181
- 崔丽英, 刘秀琴. dl-3-正丁基苯酞治疗中度急性缺血性脑卒中的多中心、随机、双盲和安慰剂对照研究[J]. 中华神经科杂志, 2005, 38(4): 251-254
- 徐皓亮, 冯亦璞. 丁基苯酞对低氧-复氧及细胞因子诱导的内皮细胞损伤及中性粒细胞黏附的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1999, 13(4): 281-284
- Hoozemans JJ, Veerhuis R, Rozemuller JM, *et al.* Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology [J]. Int J Dev Neurosci, 2006, 24: 157-165
- 吴丽蓉, 罗勇. 丁基苯酞对神经系统疾病的作用及机制明[J]. 中国临床康复与实践, 2006, 12(11): 936-938

(收稿: 2010-12-05)