文章编号:1001-6880(2014)4-0606-04

二十五味珊瑚丸对 D-半乳糖衰老鼠海马细胞形态和 GFAP 表达的影响

李　鹏[1],杨　春[1],黄福开[2*],罗远带[2],胡贤达[2],邵　杰[2],王　艳[2],刘亚丽[3],原　林[1*]

[1]南方医科大学 人体解剖学教研室暨广东省组织构建与检测重点实验室,广州 510515;

[2]中国藏学研究中心 北京藏医院,北京 100029;[3] 南方医科大学 中医药学院,广州 510515

摘　要:探讨二十五味珊瑚丸对 D-半乳糖衰老模型大鼠海马锥体细胞形态和星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达的影响。采用颈背部皮下注射 D-半乳糖制作大鼠衰老模型。于造模的第 6 周,给予二十五味珊瑚灌胃。之后取各组脑组织进行 HE 染色、GFAP 免疫组化染色以及 Western blotting。与模型组比较,二十五味珊瑚丸组大鼠海马 CA3 区锥体细胞层细胞丢失较少,细胞排列较紧密、整齐;DG 区 GFAP 阳性的星形胶质细胞数量减少,胞体较小,突起较细;海马 GFAP 表达下降,差异有显著性($P<0.05$)。D-半乳糖衰老模型大鼠海马锥体细胞衰老变性且 GFAP 的表达增多;二十五味珊瑚丸可抑制 D-半乳糖衰老模型大鼠海马锥体细胞的衰老变性和星形胶质细胞 GFAP 的表达。

关键词:二十五味珊瑚丸;D-半乳糖;衰老;锥体细胞;胶质纤维酸性蛋白

中图分类号:R741　　**文献标识码**:A

Effects of 25 Odors Coral Pills on Pyramidal Cell and the Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein in Hippocampus of D-Galactose Induced Brain Aging Rats

LI Peng[1], YANG Chun[1], HUANG Fu-kai[2*], LUO Yuan-dai[2], HU Xian-da[2], SHAO Jie[2], WANG Yan[2], LIU Ya-li[3], YUAN Lin[1*]

[1]*Department of anatomy, Key Laboratory of Construction and Detection of Guangdong Province, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China*; [2]*Beijing Tibetan Hospital, China Tibetology Research Center, Beijing 100029, China*; [3]*School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China*

Abstract: The D-galactose induced brain aging model was used to study the effect of 25 odors coral pills on hippocampus. The morphology of pyramidal cells and the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in hippocampus were determined in each experimental group. Hippocampal neuronal degeneration on CA3 region was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, the expression of GFAP was explored by immunohistochemistry, Western blotting and densitometric analysis. The results showed that compared with model group, the degeneration of hippocampal pyramidal cells on CA3 in 25 odors coral pills group was significantly improved and the number of cells positive for GFAP and the expression of GFAP in the hippocampus were significantly reduced. These results indicated that 25 odors coral pills inhibited hippocampal neuronal degeneration and the GFAP expression in the D-galactose induced brain aging rats.

Key words: 25 odors coral pills; D-galactose; aging; pyramidal cells; glial fibrillary acidic protein

星形胶质细胞在神经退行性疾病发生中起着重要作用,在脑老化及阿尔茨海默病患者脑中星形胶质细胞呈不同程度增生、肥大[1]。在衰老及相关的神经退行性病变防治中,调节星形胶质细胞的功能成为一种新的靶标[2,3]。D-半乳糖致大鼠衰老模型是一种简便优良的衰老模型,此模型神经元大量变性衰老,研究表明反应性星形胶质细胞增生参与了 D-半乳糖诱导脑衰老的病理过程[4]。二十五味珊瑚丸为藏药名方,具有开窍、通络和止痛的功效,对脑部神经血管病变具有较好的疗效。本实验选用

收稿日期:2013-11-25　　接受日期:2014-02-17

基金项目:国家重大财政专项:藏医心脑血管临床研究与药物研发(1981020421);省产业技术研究与开发资金项目(2011B010500004)

* 通讯作者 Tel:86-20-61648637;E-mail:yuanl@fimmu.com

D-半乳糖制备衰老鼠模型,之后给予二十五味珊瑚丸干预,通过 HE 染色观察海马 CA3 区锥体细胞形态,通过 GFAP 免疫组化染色和 Western blotting 法观察海马星形胶质细胞纤维酸性蛋白(GFAP)的表达情况,探讨二十五味珊瑚丸对衰老鼠海马细胞的保护作用。

1　材料与方法

1.1　动物分组与模型制备

成年 SD 雄性大鼠 18 只,体重 180 ~220 g(No. 4402101582);随机分为模型组、对照组和二十五味珊瑚丸组,每组各 6 只。模型组及二十五味珊瑚丸组颈背部皮下注射 D-半乳糖 500 mg/(kg · d)(溶于生理盐水中),对照组颈背部皮下注射生理盐水,连续给药 8 周。于造模的第 6 周,对照组、模型组给予生理盐水灌胃,二十五味珊瑚丸组给予二十五味珊瑚丸 64 mg/(kg · d)(混于生理盐水中)灌胃,连续给药 4 周。

1.2　脑组织切片的制备

灌胃 4 周后,各组大鼠用 10% 水合氯醛腹腔麻醉,固定,暴露心脏,剪开右心耳,经左心室灌注生理盐水,待肝脏颜色变浅,然后以 4% 的多聚甲醛灌注约 60 min,先快后慢,待肝脏及尾巴变硬,断头取脑,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,经 PBS 缓冲液反复浸洗,最后将脑组织脱水,透明,石蜡包埋,冠状切片(厚约 5 μm)备用。

1.3　HE 染色及 GFAP 免疫组化染色

石蜡切片烤片(65 ℃,60 min);二甲苯脱蜡(2 ×10 min);经 100% ~50% 酒精梯度脱水后入蒸馏水;苏木素染色 5 min;蒸馏水洗 2 min;1% 盐酸乙醇 1 ~3 s;流水冲洗 30 min;0.5% 伊红液染色 3 min;蒸馏水洗 2 min;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。Olympus 显微镜下观察,并拍照收集海马切面图像。

石蜡切片烤片(65 ℃,60 min);二甲苯脱蜡(2 ×10 min);经 100% ~50% 酒精梯度脱水后入蒸馏水;50% 甲酰胺 2 ×SSC,65 ℃ 2 h;2 ×SSC 洗 5 min;2 mol/L HCl 37 ℃ 30 min,0.1 mol/L 硼酸室温 10 min;1% H_2O_2 in PBS 10 min,1 ×PBS 洗 3 ×10 min;5% 山羊血清/0.3% tritonX-100 室温封闭 2 h;加 1 :100 稀释的兔抗鼠 GFAP 一抗 4 ℃过夜,用 PBS 代替一抗做阴性对照,PBS 漂洗(3 ×10 min);加入 1 :200 稀释的辣根过氧化物标记的羊抗兔 IgG 二抗,37 ℃孵育,PBS 漂洗(3 ×10 min);加新配制的 DAB 溶液,显微镜下观察 5 ~10 min;自来水充分冲洗;苏木素复染;去离子水分化;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。Olympus 显微镜下观察,并拍照收集海马切面图像。采用 Image pro Plus 6 图像分析软件,测量 GFAP 阳性细胞数和累积光密度值。

1.4　Western blotting 分析 GFAP 表达

称取各组大鼠海马组织 50 mg,液氮中研磨后,加入 300 μL RIPA 细胞裂解液,冰上静置 30 min,4 ℃、13000 g 离心 10 min,取上清,即为提取的海马组织总蛋白。BCA 蛋白定量法计算出蛋白浓度。吸取 50 μg 总蛋白,入 25% 体积电泳上样缓冲液,98 ℃加热变性 5 min。12% SDS-PAGE 分离胶,5% SDS-PAGE 积层胶电泳,上样 50 μg 总蛋白。电泳后将蛋白从 SDS-PAGE 凝胶转至 PVDF 膜上。用 5 % 的脱脂奶粉封闭 1 h。TBS-T 洗脱三次,每次 5 min。加一抗:兔多克隆抗体 GAFP 以 1:500 稀释。鼠多克隆抗体 actin 以 1:1000 稀释,4 ℃孵育过夜。次日室温孵育 30 min,TBS-T 洗脱三次,每次 5 min。加二抗:鼠抗兔二抗以 1:2000 稀释,室温孵育 2 h,BeyoECL Plus 发光液显影。Kodak Image Station 2000MM 成像系统采集图像,获得图像用图像处理软件 Image Tool 3.0 分析,用 GAFP/Actin 代表 GAFP 的相对表达量。

1.5　统计分析

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件处理,应用单因素方差分析,以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,$P < 0.05$ 为有统计学差异。

2　实验结果

2.1　各组大鼠海马 CA3 区 HE 染色

CA3 区位于海马前弯曲部,主要为锥体细胞层,

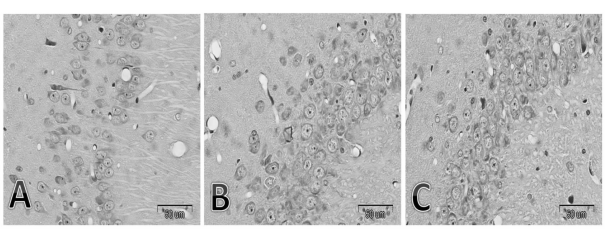

图 1　模型组(A)、对照组(B)及二十五味珊瑚丸组(C)大鼠海马 CA3 区 HE 染色图(×600)

Fig. 1　HE staining of the aging model group (A), blank control group (B) and 25 odors coral pills group (C) (×600)

HE 染色后胞浆呈红色,细胞核呈蓝色;与对照组相比,模型组锥体细胞层细胞数量明显减少,排列稀疏、紊乱,细胞间隙增大,可见核固缩;与模型组相比,二十五味珊瑚丸组锥体细胞层细胞丢失较少,细胞排列较紧密、整齐,结果见图 1。

2.2 各组大鼠海马 DG 区 GFAP 免疫组化染色

GFAP 在各组大鼠海马齿状回 DG 区均有表达,主要分布在胞浆,为黄色或棕黄色颗粒物;与对照组相比,模型组 GFAP 阳性的星形胶质细胞数量增多,胞体肥大,突起较粗;与模型组相比,二十五味珊瑚丸组 GFAP 阳性的星形胶质细胞明数量明显减少,胞体较小,突起较细,结果见图 2。

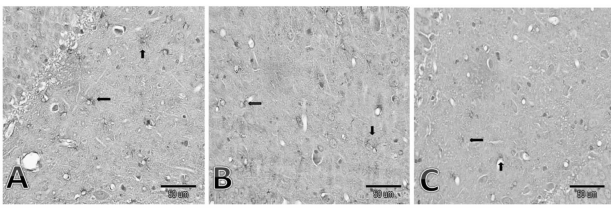

图 2 模型组(A)、对照组(B)及二十五味珊瑚丸组(C)大鼠海马齿状回 DG 区 GFAP 染色图(×600)

Fig. 2 Expression of GFAP in the aging model group (A), blank control group (B) and 25 odors coral pills group (C) (×600)

2.3 各组大鼠海马齿状回 DG 区 GFAP 阳性细胞数和累积光密度值 IOD

与对照组比较,模型组 DG 区的细胞数明显增多,累积光密度值 IOD 明显增大,差异有显著性($P<0.05$);与模型组比较,二十五味珊瑚丸组 DG 区的细胞数明显减少,累积光密度值 IOD 明显减小,差异有显著性($P<0.05$),结果见表 1。

表 1 各组大鼠海马齿状回 DG 区 GFAP 阳性细胞数和累积光密度 IOD 比较试验结果($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of the number of positive cells and integrated optical density (IOD) for GFAP in the hippocampus of rats ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

组别 Group	阳性细胞数 Number	累积光密度 IOD
模型 Aging model group	51.5±13.8*	1379.2±480.2*
空白对照 Blank control group	15.8±14.1	329.0±342.1
二十五味珊瑚丸 25 odors coral pills group	8.0±3.6**	193.7±130.8**

注:与空白对照组比较,*$P<0.05$;与模型组比较,**$P<0.05$。

Note: Compared with control, *$P<0.05$; Compared with aging model, **$P<0.05$.

2.4 Western blotting 分析各组大鼠海马 GFAP 表达

与对照组比较,模型组 GFAP 蛋白表达有增高趋势,差异有显著性($P<0.05$);与模型组相比,二十五珊瑚丸组 GFAP 蛋白表达有下降趋势,差异有显著性($P<0.05$),结果见图 3。

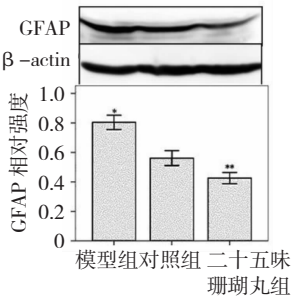

图 3 各组大鼠海马 GFAP 表达(Western blotting 分析)

Fig. 3 Expression of GFAP in different groups (Western blotting and densitometric analysis)

3 讨论

近年来研究表明,中枢神经系统内的星形胶质细胞不仅对神经元起营养、支持和保护作用,还参与神经元信息的传递并调控突触的活动,构成神经元-胶质细胞通信交互(neuron - glia intercommunication)[1,5,6]。当神经系统受到刺激和损伤,如感染,创伤,缺血和神经变性等,星形胶质细胞能敏感反应,其数目增加,胞体变大,突起变粗,生成反应性星形胶质细胞(reactive astrogliosis),其标志之一是胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的表达[7,8]。受到刺激和损伤的星形胶质细胞,其功能失调,甚至变性,会中断神经元-胶质细胞相互通信,引发神经紊乱和疾病[1]。星形胶质细胞参与脑衰老引起的神经退行性病变,在神经变性的早期,星形胶质细胞萎缩,使兴奋性毒性增加,导致突触连接中断,神经递质稳态失衡和神经细胞的死亡;而在后期,星形胶质细胞被激活,引发神经炎症[9]。因此,调节星形胶质细胞的功能成为中枢神经系统退行性疾病防治的重要靶标[2,3]。

D-半乳糖致大鼠衰老模型,表现为退行性病变,是一种简便优良的衰老模型。海马是脑内参与记忆贮存功能的重要部分,海马中与记忆有关的神经元主要是齿状回 DG 区、海马 CA1 区和 CA3 区锥体细胞。D-半乳糖衰老鼠学习记忆功能下降,齿状回 DG 区、海马 CA1 区和 CA3 区的 TUNEL 阳性细胞显

著增加,细胞萎缩和核固缩,大量神经元变性[10]。研究表明反应性星形胶质细胞增生参与了 D-半乳糖诱导脑衰老的病理过程,表现为胞体肥大和突起的增粗,GFAP 免疫组化结果显示在齿状回 DG 区和接受谷氨酸能神经纤维投射的 CA1 区辐射层尤其明显,星形胶质细胞的活化可能是增加了对兴奋性神经递质谷氨酸的摄取和水转运的结果[4,7]。

二十五味珊瑚丸为藏药名方,方中珊瑚、珍珠、磁石、朱砂等镇心安神;麝香、藏菖蒲醒脑开窍;红花、木香行气活血;葫芦、脑石利水消肿;丁香、草乌止痛,具有开窍、通络、止痛之功效,适用于"白脉病",神志不清,身体麻木,头晕目眩,血压不调,头痛,癫痫及各种神经性疼痛,对脑部神经血管病变具有较好的疗效,目前,二十五味珊瑚丸的各项研究工作较以往有了长足的进步,但是一直缺少现代药理学的研究。本方以芳香开窍,活血化瘀药物为主,研究表明,石菖蒲能降低星形胶质细胞水通道-4 基因的表达[11];麝香提取物对脂多糖所致神经细胞炎性损伤具有显著的保护作用,以 144 mg /L 浓度最佳,其可能通过减少星形胶质细胞分泌 IL-6 起作用[12]。因此,我们推测二十五味珊瑚丸对星形胶质细胞有一定的保护作用。

本实验结果显示,和对照组相比,模型组大鼠海马 CA3 区的锥体细胞层排列紊乱,数量减少,细胞萎缩和核固缩,海马齿状回 DG 区 GFAP 表达的细胞数较多,胞体和突起较肥大,海马 GFAP 蛋白表达增多,提示 D-半乳糖大鼠的海马神经元变性,星形胶质细胞被激活。和模型组相比,二十五味珊瑚丸组大鼠 CA3 区的锥体细胞层排列整齐,数量较多,细胞萎缩和核固缩减轻,齿状回 DG 区的 GFAP 表达的细胞数较少,胞体和突起较小,海马 GFAP 蛋白表达下降,说明二十五味珊瑚丸能抑制 D-半乳糖诱导的神经元变性和星形胶质细胞的过度激活,从而减轻神经元和星形胶质细胞的损伤。这些结果为拓展二十五味珊瑚丸药效和深入洞察其药理作用提供了实验资料。但对于二十五味珊瑚丸的哪些有效成分,以及通过何种途径抑制神经元变性和星形胶质细胞的激活,还有待深入研究。

参考文献

1 Rossi D, Volterra A. Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull*, 2009, 80: 224-232.

2 Kimelberg HK, Nedergaard M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics*, 2010, 7: 338-353.

3 Hamby ME, Sofroniew MV. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics*, 2010, 7: 494-506.

4 Lei M, Hua X, Xiao M, *et al*. Impairments of astrocytes are involved in the d-galactose-induced brain aging. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 369: 1082-1087.

5 Han X, Chen M, Wang F, *et al*. Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 342-353.

6 Franklin RJ, Bussey TJ. Do your glial cells make you clever. *Cell Stem Cell*, 2013, 12: 265-266.

7 Kamphuis W, Mamber C, Moeton M, *et al*. GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42823.

8 Lumpkins KM, Bochicchio GV, Keledjian K, *et al*. Glial fibrillary acidic protein is highly correlated with brain injury. *J Trauma*, 2008, 65: 778-784.

9 Verkhratsky A, Olabarria M, Noristani H N, *et al*. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 2010, 7: 399-412.

10 Zhang Q, Li X, Cui X, *et al*. D-galactose injured neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Neurol Res*, 2005, 27: 552-556.

11 Chen YY(陈艳艳), Cai LP(才丽平), Wang H(王浩), *et al*. The influence of cerebrospinal fluid contained drugs of resuscitation with aromatics to the expression of aquaporin-4mRNA of brain astrocyte. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*(现代中西医结合杂志), 2008, 17: 1783-1786.

12 Shi JF(石进峰), Zhang BA(张博爱), Jia YJ(贾延劼), *et al*. Protective Effect of Musk Extract on Rat's Cerebral Cortical Neurons with Inflammatory Injury. *C JITWM*(中国中西医结合杂志), 2010, 30: 625-629.