

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.15.004

APPswe 小鼠 β 淀粉样斑块与胶质细胞激活相关性研究*段鸣锐¹ 黄佩芝¹ 欧官用¹ 方 州¹ 沈辉帆¹ 乔新宇² 赵炜疆^{1,2Δ}

(1 汕头大学医学院神经科学中心 广东 汕头 515041; 2 江南大学无锡医学院细胞生物学教研室 江苏 无锡 214122)

摘要 目的:通过检测阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)APPswe 转基因小鼠前额叶皮质(prefrontal cortex, PFC)中 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)与胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)和离子钙结合衔接分子 1(Ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba-1)的表达相关性,进一步明确 AD 中 β 淀粉样斑块在神经胶质细胞激活中的重要作用。**方法:**选取 9 只 12 月龄 APPswe AD 小鼠,使用免疫组织化学法检测 PFC 中 A β 、GFAP 以及 Iba-1 表达,并分析 A β 与 GFAP 和 Iba-1 水平的相关性;使用免疫荧光双标法分别评价不同大小 A β 斑块分别与 GFAP 和 Iba-1 的共染情况。**结果:**免疫组织化学结果显示,AD 小鼠前额叶皮质中 A β 水平高,则 GFAP 和 Iba-1 信号水平也较高;反之,A β 水平低,GFAP 和 Iba-1 的表达水平也较低。Pearson 相关性分析结果表明 A β 水平与 GFAP($R=0.6677, P<0.05$)和 Iba-1($R=0.8257, P<0.05$)的水平呈正相关,且与 GFAP 相比,Iba-1 显示出与 A β 水平更高的表达相关性。与免疫组织化学结果一致,免疫荧光双标法结果亦表明小鼠 PFC 中较大的 A β 斑块所在区域 GFAP 或 Iba-1 荧光信号强度及范围亦大于较小的 A β 斑块所在区域 GFAP 或 Iba-1 荧光信号强度。**结论:**AD 小鼠前额叶皮质中 A β 水平与 GFAP 和 Iba-1 的表达量呈正相关,表明 A β 形成在神经胶质细胞的激活中发挥重要作用。

关键词:阿尔茨海默症;APPswe 小鼠; β 淀粉样斑块;神经炎症;GFAP;Iba-1

中图分类号:R749.16;R741.02 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)15-2819-04

Correlation Study on the Roles of Glial Cell Activation in APPswe Mice*

DUAN Ming-rui¹, HUANG Pei-zhi¹, OU Guan-yong¹, FANG Zhou¹, SHEN Hui-fan¹, QIAO Xin-yu², ZHAO Wei-jiang^{1,2Δ}

(1 Center for Neuroscience, Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong, 515041, China;

2 Cell Biology Department, Wuxi Medical College, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, 214122, China)

ABSTRACT Objective: To verify the relationship between β -amyloid (A β) plaques and glial cell activation by testing the correlation between A β and glial fibrillary acidic protein (GFAP) or ionized calcium binding adaptor molecule-1 (Iba-1) in the prefrontal cortex (PFC) of an Alzheimer's Disease (AD) APPswe mouse model. **Methods:** Nine 12-month-old APPswe AD mice were included. The expression of A β , GFAP, and Iba-1 in the PFC was detected by immunohistochemistry, and the correlation of A β with either GFAP or Iba-1 level was analyzed. The co-existence of different sized A β plaques with either GFAP or Iba-1 was detected by double-immunofluorescence labeling assay. **Results:** Immunohistochemical results showed that higher levels of A β in the PFC of AD mice were associated with higher levels of GFAP and Iba-1. On the contrary, lower levels of A β were associated with lower levels of GFAP and Iba-1 expression. Pearson correlation analysis showed that A β level was positively correlated with that of GFAP ($R=0.6677, P<0.05$) and Iba-1 ($R=0.8257, P<0.05$), respectively. Immunofluorescence double labeling results also demonstrated that the region with large sized A β plaques showed a higher fluorescence signal intensity of both GFAP and Iba-1 in the PFC of AD mice when compared to that with small sized A β plaques. **Conclusions:** The level of A β was positively correlated with those of GFAP and Iba-1 in the PFC of AD mice, suggesting that A β formation plays an important role in neuroinflammation induced by the activation of glial cells.

Key words: Alzheimer's Disease (AD); APPswe mouse; β -Amyloid plaque; Neuroinflammation; GFAP; Iba-1

Chinese Library Classification (CLC): R749.16; R741.02 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)15-2819-04

前言

阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)又称老年痴呆症,是一种不可逆的进行性中枢神经系统(central nervous system, CNS)退行性疾病,死亡率随年龄增长而急剧增加,预计到 2050 年,全球患病人数将达到 1.315 亿^[12]。AD 的典型病理学特征主

要包括神经元外 β -淀粉样蛋白斑块沉积、神经元内 tau 蛋白的过度磷酸化产生的神经纤维缠结以及神经元丢失并伴随胶质细胞激活^[3-5]。AD 的临床治疗以对症治疗为主,常用的 AD 治疗药物主要包括两类:一类是胆碱酯酶抑制剂,如多奈哌齐、加兰他敏。这类药物通过抑制乙酰胆碱酯酶而增加中枢神经系统的乙酰胆碱浓度和活性;另一类是兴奋性氨基酸受体拮抗剂,如

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81471279;81171138)

作者简介:段鸣锐(1994-),男,硕士研究生,研究方向:阿尔茨海默症,电话:18104586836, E-mail: 754478252@qq.com

Δ 通讯作者:赵炜疆,男,博士,教授,研究方向:神经系统退行性疾病, E-mail: weijiangzhao@jiangnan.edu.cn

(收稿日期:2021-01-06 接受日期:2021-01-29)

盐酸美金刚,主要用于治疗中重度 AD 患者^[6-8]。

神经胶质细胞作为间质细胞分布于神经元之间,在中枢神经系统含量丰富,与神经元共同参与机体内 CNS 的分布与调节,对神经网络发育起着至关重要的作用。星形胶质细胞和小胶质细胞是神经系统内最主要的两类神经胶质细胞,均可参与神经系统的调节反应,其增生激活与多种神经系统疾病的发生和发展密切相关^[9-12]。研究表明,胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP) 可作为星形胶质细胞增生的标志物,而离子钙结合衔接分子 1 (Ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba-1)可作为小胶质细胞激活的标志物,且 GFAP 和 Iba-1 的表达水平均直接与 AD 的恶化程度密切相关^[13,14]。基于此,本文具体探讨 AD 小鼠前额叶皮质中 A β 水平与 GFAP 以及 Iba-1 的相关性,为 AD 发生过程中,神经胶质细胞激活机制及相关治疗研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

兔抗 APP 多克隆抗体、兔抗 GFAP 多克隆抗体、水溶性封片剂(武汉博士德生物有限公司),兔抗 Iba-1 多克隆抗体(Proteintech 中国公司);6E10 小鼠抗 APP 单克隆抗体(美国 Biolegend 公司);DylightTM488 标记驴抗小鼠抗体、DylightTM594 标记驴抗兔抗体(美国 Jackson ImmunoResearch Laboratories 公司);AEC 显色液、磷酸盐缓冲液(PBS)、柠檬酸盐缓冲液、通用二步法试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);异氟烷(艾斯美 Baxter Healthcare Corporation of Puerto Rico 公司);Pro-long Gold 抗荧光淬灭剂(含 DAPI)(美国 Life Technologies 公司);通用型抗体稀释液(新赛美生物科技有限公司);Feica 颗粒状石蜡(苏州蚂蚁淘生物科技有限公司);乙醇、二甲苯(汕头西陇化工股份有限公司);博冠生物电子显微镜(广州 BOSMA 企业有限公司);F1000 激光共聚焦显微镜(日本 OLYMPUS 光学公司);水浴锅(郑州南北仪器设备有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物 实验小鼠为 APPswe 转基因 12 月龄的小鼠,由汕头大学医学院神经科学中心提供。所有小鼠饲养于汕头大学医学院实验动物中心,饲养条件为:温度 18~25℃,12 h:12 h 昼夜交替,自由摄食与饮水。小鼠实验操作遵循汕头大学医学院动物伦理委员会相关规定(实验动物许可号:SYXK(粤)2017-0079)。

1.2.2 小鼠脑石蜡标本制作 取 12 月龄的 APPswe 转基因小鼠 9 只,分别放入加有异氟烷的麻醉盒中,待其进入麻醉状态后,断头,剪开颅骨,剥开脑膜,并取出大脑组织,放入 4%多聚甲醛中充分固定 7 天。7 天后将脑组织移入 PBS 溶液中浸泡 3 天,充分置换多聚甲醛后,使用 70%~100%酒精梯度脱水后将组织置于二甲苯溶液 2 次,之后行浸蜡和包埋。使用石蜡切片机行前额叶组织 4 μ m 厚度石蜡切片,并固定于载玻片上,用于后续形态学实验研究。

1.2.3 免疫组织化学染色 将石蜡切片置于 60℃烤片机烤片 45 min,二甲苯脱蜡,用 100%~65%酒精梯度水化。抗原修复液(柠檬酸盐缓冲液)置于 99℃水浴锅中预热 15 min,再将水化后石蜡切片置于修复液中,抗原修复 40 min 后自然冷却至室温。加入 0.3%过氧化氢酶阻断剂于脑组织切片,室温孵育 10 min,

再用通用型抗体稀释液封闭 10 min,分别滴加按 1:200 稀释的兔抗 APP 多克隆抗体、兔抗 GFAP 多克隆抗体、兔抗 Iba-1 多克隆抗体,并放入湿盒于 4℃孵育过夜。弃掉一抗,滴加反应增强剂室温孵育 1 h 后,滴加增强酶标记山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物室温孵育 3 h。使用 AEC 显色液显色,并使用水溶性封片剂封片,静置,24 h 后可见光显微镜下观察拍照。使用 Image J 软件(美国国立卫生研究院),通过密度测量,对每个分子的染色强度进行量化。

1.2.4 免疫荧光化学染色 将石蜡切片脱蜡、水化、抗原修复后(方法同 1.2.3),滴加通用型抗体稀释液封闭 30 min,分别滴加小鼠抗 APP/兔抗 GFAP 和小鼠抗 APP/兔抗 Iba-1 抗体混合液进行荧光双标染色,4℃孵育过夜。避光滴加驴抗小鼠(1:500)和驴抗兔(1:500)抗体混合液并孵育 2 h。滴加含有 DAPI 的 pro-long Gold 抗荧光淬灭封片剂并封片,室温避光放置 24 h 后使用激光共聚焦显微镜进行拍照。

1.3 统计学分析

使用 Graphpad Prism 8 进行数据处理和编辑。采用 SPSS 25.0 软件通过 Pearson 相关性分析分析,评价 AD 小鼠 PFC 中 A β 水平与 GFAP 和 Iba-1 相关性。 $P<0.05$ 表示相关性具有显著性。

2 结果

2.1 A β 斑块大小与胶质细胞标志物表达水平的相关性

免疫组织化学结果显示,12 周龄 APPswe 小鼠 PFC 中可见大量多个散在分布的 A β 淀粉样斑块,同一脑区亦可见散在分布强弱不等的 GFAP 和 Iba-1 阳性信号(图 1(A))。PFC 中 A β 水平高,则 GFAP 和 Iba-1 信号水平也较高;反之,A β 水平低,GFAP 和 Iba-1 的表达水平则较低(图 1(A))。Pearson 相关性分析结果表明 A β 水平与 GFAP($r=0.6677, P<0.05$)和 Iba-1($r=0.8257, P<0.05$)的表达量呈显著正相关,且与 GFAP 相比,Iba-1 显示出与 A β 水平具有更高的相关性(图 1(B)和图 1(C))。

2.2 A β 与胶质细胞标记物共表达分析

免疫荧光双标分析结果显示,AD 小鼠前额叶皮质中,A β 大斑块(LP)所在区域 GFAP 荧光信号较强,面积较大,而 A β 小斑块(SP)所在区域 GFAP 荧光信号较低,面积较小(图 2(A))。A β /Iba-1 免疫荧光双标分析结果显示,AD 小鼠前额叶皮质中,A β 大斑块(LP)所在区域 Iba-1 荧光信号较强,范围较大,而 A β 小斑块(SP)所在区域 Iba-1 荧光信号较低,范围较小(图 2(B))。

3 讨论

A β 是由 β -分泌酶和 γ -分泌酶依次裂解神经元 β -淀粉样前体蛋白而形成的由 40-42 个氨基酸组成的多肽。AD 病理条件下,过量的 A β 聚集并形成低聚物,在大脑中沉积并形成斑块,可通过神经毒性作用参与 AD 发生发展过程。A β 的沉积不仅与神经元的退行性病变有关,而且可激活一系列病理事件,包括星型胶质细胞和小胶质细胞的激活等^[15-17]。本研究结果显示 AD 小鼠前额叶皮质中都有不同程度的 A β 斑块聚集,随着 A β 斑块大小变化,GFAP 和 Iba-1 也随之变化。通常在正常生理情况下,GFAP 和 Iba-1 在大脑内表达量较低,而在 AD 病

理状态下随着 A β 斑块的形成与扩大,GFAP 和 Iba-1 表达量也随之上调。这些结果表明,A β 表达水平高低与神经胶质细胞激活程度关系密切。

星形胶质细胞是 CNS 中主要细胞之一,具有建立和维护血脑屏障、调节神经元周围的离子微环境、参与神经元功能调节等功能。GFAP 是一种含多种亚型的中间丝蛋白家族,是反

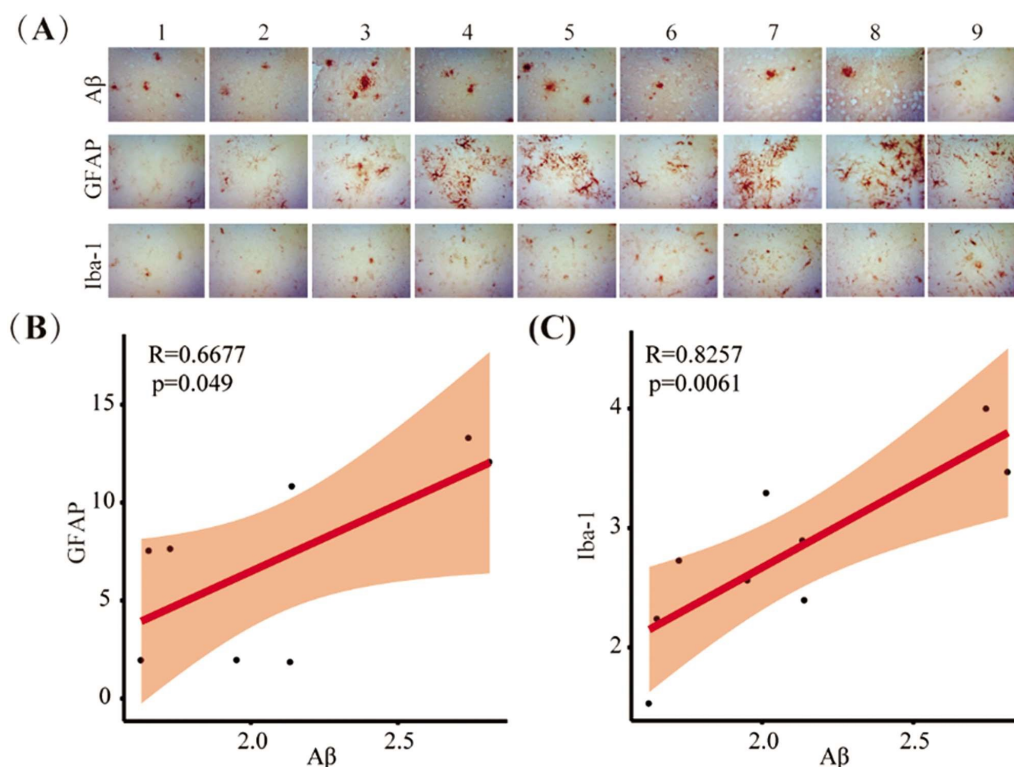


图 1-A 各组小鼠前额叶皮质组织病理切片免疫组织化学染色分析结果(400 $\times$);图 1-B A β 与 GFAP 相关性分析结果;图 1-C A β 与 Iba-1 相关性分析结果。

Fig.1-A Immunohistochemical staining of A β , GFAP, and Iba-1 in the PFC of each APPswe mouse (400 $\times$); Fig.1-B Correlation analysis of A β and GFAP; Fig.1-C Correlation analysis of A β and Iba-1.

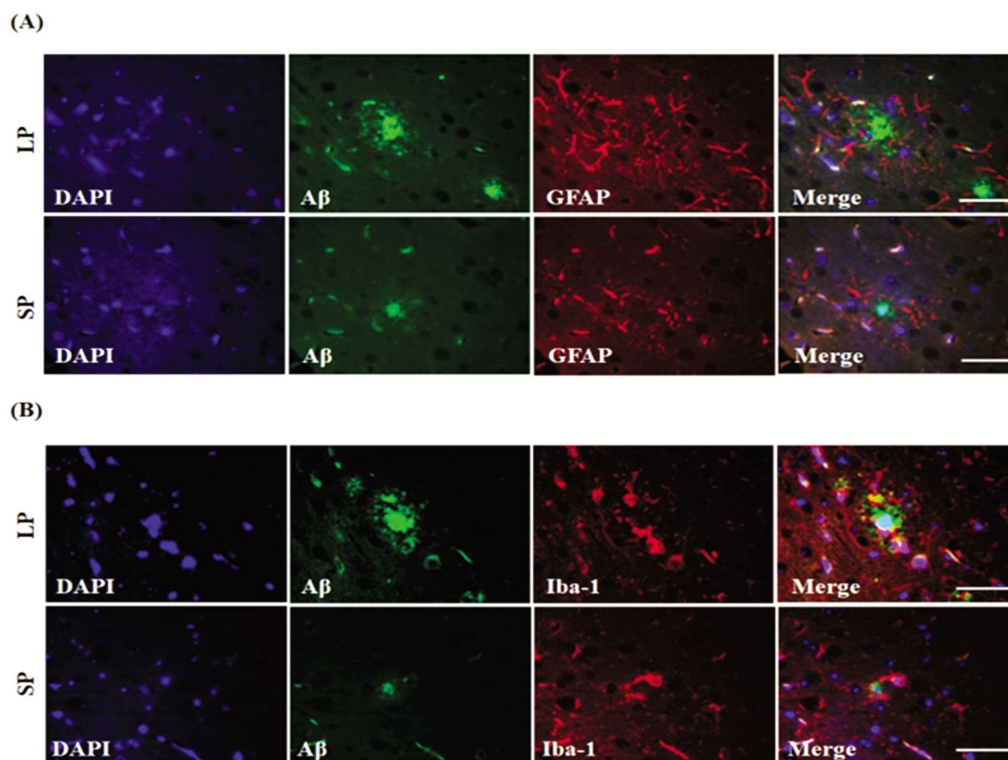


图 2 AD 小鼠前额叶皮质 A β 与 GFAP 和 Iba-1 免疫荧光共定位表达分析结果(LP:大斑块(large plaque);SP:小斑块(small plaque))标尺:50 μ m.
Fig.2 Double-immunofluorescence labeling of A β with eotjer GFAP or Iba-1 in the PFC of APPswe mice (LP: large plaque; SP: small plaque) Scale bar, 50 μ m.

反应性星形胶质细胞瘤的典型标记物。生理条件下,GFAP 在细胞内或细胞外可自发降解;病理条件下,星形胶质细胞反应性增生,GFAP 表达水平增高^[18-21]。Iba-1 是一种反映小胶质运动和迁移的细胞质蛋白,特异性表达于小胶质细胞。小胶质细胞分布于大脑和脊髓胶质中,在正常情况下参与大脑内环境稳态维持。神经系统功能紊乱可导致小胶质细胞激活,持续释放一系列炎症介质,导致氧化应激反应,转变为吞噬细胞,发挥清除坏死神经元等作用^[22-24]。本研究结果显示 A β 与 GFAP 和 Iba-1 均存在显著相关性,且 Iba-1 与 A β 相关性高于 GFAP,表明小胶质细胞在 A β 斑块诱导的炎症反应中发挥较为重要的作用,并可能一定程度上参与星形胶质细胞反应性增生。

研究表明 A β 可作用于小胶质细胞表面受体,而针对相关信号通路的靶向治疗可能通过影响早期小胶质细胞激活或者调节小胶质细胞表型的改变减少 AD 相关炎症反应^[25]。目前,具有神经保护作用的 Iba-1 阳性小胶质细胞的表型形成机制尚未完全明确,未来可在明确表型的基础上,积极开展新型药物研发。此外,Regen 等^[26]发现二甲胺四环素等化合物可通过不同靶向影响小胶质细胞极化而成为治疗 AD 的新药。这些化合物可通过改变早期信号靶点影响小胶质细胞极化,延缓 AD 炎症的产生^[27]。此外,活化的星形胶质细胞也可通过释放肽聚糖等微生物中保守的小分子基序和细胞炎症因子,如 TNF- α 等,促进血脑屏障修复,使炎症消退,从而发挥抗炎作用^[28]。如何在 AD 早期出现症状时利用星形胶质细胞的保护作用,同时在合适的时间抑制其活性,这是未来 AD 治疗中需要解决的一个重要问题。

本研究发现表明 AD 小鼠前额叶皮质 A β 水平与小胶质细胞激活和星形胶质细胞反应性增生高度相关,提示通过抑制 A β 形成改善 PFC 脑组织神经炎症反应,有利于进一步缓解 AD 症状,可能为 AD 的临床治疗和药物研发提供一定参考。

参考文献(References)

- [1] 2020 Alzheimer's disease facts and figures [R]. Alzheimer's Association, 2020, 16(3): 391-460
- [2] Sengoku R. Aging and Alzheimer's disease pathology[J]. Neuropathology, 2020, 40(1): 22-29
- [3] John A, Reddy PH. Synaptic basis of Alzheimer's disease: Focus on synaptic amyloid beta, P-tau and mitochondria[J]. Ageing research reviews, 2020, 65: 101208
- [4] Anand A, Patience AA, Sharma N, et al. The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer's disease: A comprehensive review[J]. European journal of pharmacology, 2017, 815: 364-75
- [5] Uddin MS, Stachowiak A, Mamun AA, et al. Autophagy and Alzheimer's Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Implications[J]. Frontiers in aging neuroscience, 2018, 10: 04
- [6] Bondi MW, Edmonds EC, Salmon DP. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future [J]. Journal of the International Neuropsychological Society: JINS, 2017, 23(9-10): 818-31
- [7] Matsunaga S, Kishi T, Iwata N. Memantine monotherapy for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis [J]. PloS one, 2015, 10(4): e0123289
- [8] Guo J, Wang Z, Liu R, et al. Memantine, Donepezil, or Combination Therapy-What is the best therapy for Alzheimer's Disease? A Network Meta-Analysis[J]. Brain and behavior, 2020, 10(11): 01831
- [9] Acosta C, Anderson HD, Anderson CM. Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease[J]. Journal of neuroscience research, 2017, 95(12): 2430-2447
- [10] Dietz AG, Goldman SA, Nedergaard M. Glial cells in schizophrenia: a unified hypothesis[J]. The lancet Psychiatry, 2020, 7(3): 272-81
- [11] Greenhalgh AD, David S, Bennett FC. Immune cell regulation of glia during CNS injury and disease [J]. Nature reviews Neuroscience, 2020, 21(3): 139-152
- [12] Dzamba D, Harantova L, Butenko O, et al. Glial Cells - The Key Elements of Alzheimer's Disease [J]. Current Alzheimer research, 2016, 13(8): 894-911
- [13] Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, et al. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge[J]. Glia, 2016, 64(2): 300-316
- [14] van Bodegraven EJ, van Asperen JV, Robe PAJ, et al. Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma[J]. Glia, 2019, 67(8): 1417-1433
- [15] Baulch JE, Acharya MM, Agrawal S, et al. Immune and Inflammatory Determinants Underlying Alzheimer's Disease Pathology [J]. Journal of neuroimmune pharmacology, 2020, 15(4): 852-862
- [16] Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease [J]. Frontiers in neuroscience, 2018, 12: 25
- [17] Chen GF, Xu TH, Yan Y, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development [J]. Acta pharmacologica Sinica, 2017, 38(9): 1205-1235
- [18] Paul P, McKeon A, Pittcock SJ, et al. GFAP IgG associated inflammatory polyneuropathy [J]. Journal of neuroimmunology, 2020, 343: 577233
- [19] Siracusa R, Fusco R, Cuzzocrea S. Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies[J]. Frontiers in pharmacology, 2019, 10: 1114
- [20] Zhang S, Wu M, Peng C, et al. GFAP expression in injured astrocytes in rats [J]. Experimental and therapeutic medicine, 2017, 14 (3): 1905-1908
- [21] Luo Y, Yan W, Zhou Z, et al. Elevated Levels of NLRP3 in Cerebrospinal Fluid of Patients With Autoimmune GFAP Astrocytopathy [J]. Frontiers in neurology, 2019, 10: 1019
- [22] Friker LL, Scheiblich H, Hochheiser IV, et al. β -Amyloid Clustering around ASC Fibrils Boosts Its Toxicity in Microglia [J]. Cell reports, 2020, 30(11): 3743-54.e6
- [23] Hansen DV, Hanson JE, Sheng M. Microglia in Alzheimer's disease [J]. The Journal of cell biology, 2018, 217(2): 459-472
- [24] Tischer J, Krueger M, Mueller W, et al. Inhomogeneous distribution of Iba-1 characterizes microglial pathology in Alzheimer's disease[J]. Glia, 2016, 64(9): 1562-1572
- [25] Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? [J]. Nature reviews Neurology, 2020[Epub ahead of print]
- [26] Regen F, Hellmann-Regen J, Costantini E, et al. Neuroinflammation and Alzheimer's Disease: Implications for Microglial Activation [J]. Current Alzheimer research, 2017, 14(11): 1140-1148
- [27] Waller R, Baxter L, Fillingham DJ, et al. Iba-1-/CD68+ microglia are a prominent feature of age-associated deep subcortical white matter lesions[J]. PloS one, 2019, 14(1): e0210888
- [28] Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation[J]. Nature reviews Neuroscience, 2015, 16(5): 249-263