

①

LPS 诱导小鼠脑星形胶质细胞激活及 Bcl-2 表达的变化

邓小华¹, 刘 晟², 蔡维君¹, 雷德亮¹, 罗学港¹

(中南大学 1. 湘雅医学院人体解剖学与神经生物学系, 长沙 410078;

2. 湘雅三医院放射科, 长沙 410013)

[摘要] 目的: 探讨神经元和星形胶质细胞对外源性内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激的反应, 以及在对抗炎症反应时二者的相互关系。方法: 成年 C57BL/6J 小鼠分成实验对照组和实验组, 采用免疫组织化学和 GFAP 和 Bcl-2 免疫荧光双重标记技术, 观察小鼠单次注射 LPS 入侧脑室后, GFAP 和 Bcl-2 在脑内的分布、表达及时程变化, 以及 GFAP 阳性星形胶质细胞与 Bcl-2 阳性神经元之间的关系。结果: PBS 注射的对照组动物脑内 GFAP 阳性的星形胶质细胞主要分布于海马、梨状皮质、内嗅皮质、隔区、纹状体、杏仁核及主要的纤维束。LPS 注射 2 d 后, GFAP 阳性的星形胶质细胞明显被激活, 尤其在脑室周围的脑实质, 表现为细胞胞体相对增大, 突起变粗。Bcl-2 阳性神经元在注射后 1 d 出现表达, 2 d 明显增加, 4 d 为表达高峰。Bcl-2 阳性神经元分布在第一、二运动皮质和躯体感觉皮质、隔、斜角带核、海马和中脑红核等。LPS 注射 4 d 后, GFAP 和 Bcl-2 免疫荧光双重标记染色切片显示: 在脑内没有发现 GFAP 和 Bcl-2 双标细胞, 但可见 GFAP 阳性星形胶质细胞和 Bcl-2 阳性神经元重叠。星形胶质细胞的突起可见于 Bcl-2 免疫荧光阳性神经元的鞘中。结论: LPS 能诱导脑室周围的脑实质星形胶质细胞和神经元的激活, 激活的星形胶质细胞和神经元可能参与脑内的免疫调节和保护性反应。星形胶质细胞的突起可见于 Bcl-2 免疫荧光阳性神经元的鞘中, 表明两者之间关系密切。

[关键词] 脂多糖; 星形胶质细胞; Bcl-2; 免疫组织化学; 免疫荧光

[中图分类号] R322.81 [文献标识码] A [文章编号] 1672-7347(2007)03-0401-07

Astrocyte activation and Bcl-2 protein expression induced by lipopolysaccharide in mouse brain

DENG Xiao-hua¹, LIU Sheng², CAI Wei-jun¹, LEI De-liang¹, LUO Xue-gang¹

(1. Department of Anatomy and Neurobiology, Xiangya School of Medicine, Changsha 410078; 2. Department of Radiology, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of anti-apoptotic protein Bcl-2 expression in neurons and activation of brain astroglial cells, and the relationship between astrocytes and neurons in mice after a single intracerebroventricular (ICV) stereotaxic injection of lipopolysaccharide (LPS). **Methods** C57BL/6J mice of different ages were divided into a control group and an experiment group. Immunohistochemistry to Bcl-2 and that to GFAP were conducted to observe the expression of Bcl-2 protein in neurons and GFAP in astrocytes in the brain at different time-points after the LPS injection. The glial cell type expressing Bcl-2 was characterized with immunofluorescence double label-

①收稿日期(Date of reception) 2006-06-22

作者简介(Biography) 邓小华(1964-),女,湖南祁东人,副教授,博士,主要从事神经炎症和脑的 aging 研究。

通讯作者(Corresponding author) 罗学港, E-mail: xgluo@xysm.net

基金项目(Foundation items) 意大利维罗纳大学医学院形态学与生物医学系和中南大学湘雅医学院人体解剖学与神经生物学系合作项目;意大利卫生部和欧盟委员会基金支助课题(QLK6-CT-2002-02258) This was a collaborative scientific project between Department of Morphological and Biomedical Sciences, the Medical Faculty of the University of Verona, Italy and Department of Anatomy and Neurobiology, Xiangya School of Medicine of Central South University, China. This work was supported by Italian Ministry of Health and the European Commission (QLK6-CT-2002-02258)

ling. **Results** GFAP-immunoreactive cells in the control mice were observed mainly within hippocampal formation, piriform, entorhinal cortex, septum, striatum, amygdaloid nucleus, subcortical white matter, as well as in the main fiber tracts. At 24 h after the LPS treatment there was no obvious difference in GFAP immunoreactivity compared with the controls. Astrocytes were markedly activated in periventricular brain regions such as hippocampus, the hypothalamic parenchyma surrounding the third ventricle, with larger cell body and hypertrophic processes 2 days after the endotoxin treatment. After the LPS injection, Bcl-2 positive cells were distributed widely in the brain, such as in the cortex (primary and secondary motor cortex, somatosensory cortex), hypothalamic parenchyma surrounding the third ventricle, diagonal band, hippocampus, septum and the red nucleus of the mid-brain. At these sites, Bcl-2 induction increased significantly 2 days after the ICV LPS injection, with some subregional differences, peaking on 4th day. No immunofluorescent double labeling cells for GFAP and Bcl-2 were observed in the brain of the mice after the LPS administration, but merging GFAP positive astrocytes and Bcl-2 positive neurons were seen. Double staining for Bcl-2 and GFAP also showed that the projections of activated astrocytes were found in the sheath of Bcl-2 positive neurons 4 days after the ICV LPS administration. **Conclusion** LPS can activate astroglial cells and upregulate of Bcl-2 expression in the neurons in the mouse brain, which may participate in the administration of central nervous system to central-immunity stimulated regulation and the protective response to the inflammatory stimulus. The projections of activated astrocytes are found in the sheath of Bcl-2 positive neurons, indicating that there is close relationship between astrocytes and neurons.

Key words: lipopolysaccharide; astrocytes; Bcl-2; immunohistochemistry; immunofluorescence

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2007,32(3):0401-07]

神经系统与免疫系统之间存在双向信息交流,宿主对炎症的反应受到中枢神经系统(central nervous system, CNS)的调节。研究表明,脑内存在广泛的神经元-胶质细胞信息网络^[1]。在 CNS 病损时,不仅导致神经元发生形态和功能的改变,同时,也造成神经胶质细胞形态与机能的变化^[2-3]。

星形胶质细胞是参与脑内炎症反应的主要免疫细胞。是 CNS 中的主要吞噬细胞,它活化后可以清除坏死的细胞,同时,星形胶质细胞活化后,胶质细胞原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达上升,细胞肥大,并可见胶质增生,星形胶质细胞数量大大增加。以助于宿主防御和修复^[4-5]。在机体受到外周免疫刺激时,星形胶质细胞的改变及与神经元的关系尚未见报道。本实验通过单次注射 LPS 入侧脑室,以期其随脑脊液循环进入脑组织后,诱导脑实质的急性炎症反应,然后利用免疫组织化学 ABC 法与免疫荧光双标记观察反应性神经元(以 Bcl-2 作标记物)和星形胶质细胞(以 GFAP 作标记物)在脑的分布、时间规律及两者的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物 成年 C57BL/6J 小鼠 36 只(体质量 20 ~ 40 g),安静温暖、避强光的环境中饲养。随机分为实验组($n = 18$)和对照组($n = 19$)。

1.2 动物模型及切片制备 所有注射都在 Zeitberger times (ZT 2- ZT 9) 之间即 8:00 am 点至 5:00 pm 之间进行。(1)腹腔注射 6% 水合氯醛(340 mg/kg. wt)麻醉;(2)将小鼠头部固定于立体定位仪,耳棒放在耳前颞骨上(耳棒为中空,一边可调),使小鼠头部保持水平,方可注射;(3)在手术显微镜帮助下,参考小鼠图谱^[6],以前囟为零点值,于前囟后 0.25 mm,中线右侧 1.0 mm 处,用电钻钻开颅骨,切开硬脑膜,于前囟后 0.25 mm,中线右侧 1.0 mm 处用微量注射器自脑表面垂直进针 2.5 ~ 3.0 mm;(4)降低微量注射针,自脑表面垂直进针 2.5 ~ 3.0 mm;缓慢注入 LPS 4 μL (50 ng/ μL , Sigma),留针 5 ~ 10 min;(5)拔针,缝合皮肤,松解小鼠,送回动物房让其自然苏醒,动物分别存活 1, 2 和 4 d。对照组用生理盐水 4 μL 替代 LPS 侧脑室注射,动物分别存活 1, 2 和 4

d. 动物达到存活时间点,经左心室快速灌注固定,生理盐水后 4% 多聚甲醛,先快后慢。取脑后固定 2 h,浸 30% 蔗糖过夜,恒低温冰冻切片机, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 切片,片厚 $30\text{ }\mu\text{m}$ 。每组取 5 只动物,各动物脑片每隔 6 片收入一个系列,每一个系列切片供下一种实验方法处理。

1.3 免疫组织化学染色及免疫荧光双标记染色

所用试剂的后面刮号内均为其稀释度和购买的公司。除特别说明者外,所有抗体都用含 0.2% Triton X-100, 2% 正常羊血清, 0.1% 叠氮钠和 1% BSA 的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.4) 稀释。

1.3.1 GFAP 和 Bcl-2 免疫组织化学染色

将切片用 0.01 mol/L PBS 清洗后,置于 1% 双氧水溶液中 20 min 以去除内源性过氧化物酶;再将切片用 0.01 mol/L PBS 清洗后,用 5% 正常羊血清室温下封闭 1 h,将切片置于一抗中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,一抗分别为兔抗 GFAP 多克隆抗体 (1:200, Glostrup) 和兔抗 Bcl-2 多克隆抗体 (1:100, Biotechnology)。切片用 0.01 mol/L PBS 充分清洗后,将切片置于生物素标记的二抗羊抗兔 IgG (1:200, Vector)。室温下孵育 1 h,用 0.01 mol/L PBS 充分清洗后,将切片置于 ABC 混合液中 (1:200, Vector) 室温下孵育 1 h, 0.05% 二氨基联苯胺 DAB (Sigma) 及双氧水中显色,呈色后用缓冲液终止反应并晾干切片。梯度酒精脱水,二甲苯透明封片。

1.3.2 GFAP 与 Bcl-2 免疫荧光双标记染色

为了明确脑内表达 Bcl-2 的神经胶质细胞的类型,用 GFAP 抗体与 Bcl-2 抗体对 LPS 和 PBS 切片进行免疫荧光双标记染色。切片经过 Bcl-2 一抗孵育后,用 0.01 mol/L PBS 充分清洗后,并置于荧光二抗 Cy^{TM2} 猴抗兔 IgG (11:100, Jackson) 孵育 2 h。将切片用 0.01 mol/L PBS 清洗后,用 5% BSA (0.2% Triton X-100) 室温下封闭 1 h,将切片置于鼠抗 GFAP 单克隆抗体 (11:500, Chemicon, 以含 0.2% Triton X-100, 0.1% NaN_3 , 1% BSA 的 PBS 稀释) 中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,切片用 0.01 mol/L PBS 充分清洗后,将切片置于荧光二抗 Texas-Red 标记的马抗小鼠 IgG (1:100, Vector) 室温下孵育 2 h。切片用 0.01 mol/L PBS 充分清洗后,并在暗处晾干切片。用 0.01% DABCO (Fluka, Buchs) 封片。用共聚焦显微镜 (Zeiss LSM 510) 激光扫描免疫荧光双标记染色的切片,所得图像用 Zeiss LMS 5 Image Browser software 进行分析。

1.4 替代实验 将已知阳性切片作为阳性对照,用 0.01 mol/L PBS 或正常 5% BSA 分别代替

一抗,作为阴性对照,按 ABC 法进行免疫组化染色,结果为阴性。

1.5 数据收集 所用资料 and 数据分析程序与 Kong 描述的相同^[7]。简言之,在显微镜 (BX51, Olympus, Japan) 的屏幕上,定性地观察脑内神经元和神经胶质细胞的形态变化。不同倍数的物镜下摄取图像,存入计算机后采用图像分析系统软件 software Image Pro Plus 4.5 for Windows (Media Cybernetics, Silver Springs, MD) 进行定量的分析处理,包括单位面积下的细胞数和灰度值。

1.6 统计学处理 所得数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,通过 SPSS10.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA)。对各组间均数用 Bonferroni post-hoc tests 分析,进行两两比较。 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脑室内注射 LPS 后星形胶质细胞的反应

PBS 注射的对照组和 LPS 注射的实验组中,GFAP 阳性的星形胶质细胞分布在梨状皮质、内嗅皮质、隔区、整个海马结构、纹状体、杏仁核皮质下白质及主要的纤维束。PBS 注射的对照组动物,海马 CA3 区 GFAP 阳性的星形胶质细胞展示出静息的形态特征,胞体小,分支细、短,染色淡 (图 1A, B)。在 PBS 注射后 24h,GFAP 阳性的星形胶质细胞分布在皮质浅层,第三脑室周围的下丘脑实质结构,以及中脑水管周围的灰质。从注射后第 2 天起,GFAP 阳性的星形胶质细胞的密度在皮质的针道周围有所增加。在 LPS 注射后 24 h,海马、隔、纹状体及皮质包括梨状皮质、内嗅皮质,GFAP 阳性的星形胶质细胞数量和密度值,与对照组比较,没有明显差异。注射 2 d 后,密度明显增加。(图 1C, D) 显示海马 CA3 区内激活的星形胶质细胞的形态特征,细胞胞体相对增大,突起肥大,GFAP 免疫反应产物着色加深,尤其在海马内明显。LPS 注射 4 d 后,实验组 GFAP 阳性的星形胶质细胞明显激活。定量分析证明 (图 2A, B),LPS 处理 2 d 后,海马 CA3 区内 GFAP 阳性的星形胶质细胞数量和密度值与 PBS 注射的对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 脑室内注射 LPS 后神经元内抗凋亡蛋白

Bcl-2 的表达 Bcl-2 阳性神经元主要分布在第一、二运动皮质第 V 层和躯体感觉皮质、隔、斜角带核、海马和中脑红核等。Bcl-2 免疫反应产物位于胞质及突起内,呈棕色,胞核不显色。Bcl-2 阳

性神经元在注射后 1 d 出现表达,注射后 2 d 为表达高峰。在 LPS 注射 24 h 后,与对照组比较,皮质、海马、隔内 Bcl-2 阳性的神经元没有明显的差异。PBS 注射后 2 d,皮质、海马内细胞 Bcl-2 免疫反应产物弱阳性(图 1E)。LPS 注射 2 d 后,皮质内的细胞数目和密度明显增加,4 d 后达到高峰。显示小鼠皮质内激活的 Bcl-2 阳性细胞的形态特征:胞质及突起内 Bcl-2 免疫反应产物着色加深(图 1F)。GFAP 和 Bcl-2 免疫荧光双重标记染色切片显示:在脑内没有发现 GFAP 和 Bcl-2 双标细

胞,即激活的星形胶质细胞不表达 Bcl-2,但可见 GFAP 阳性星形胶质细胞和 Bcl-2 阳性神经元重叠。星形胶质细胞的突起可见于 Bcl-2 免疫荧光阳性神经元的鞘中(图 3A,C)。LPS 处理 2 d 后,小鼠脑室周围的脑实质 Bcl-2 阳性神经元明显被激活,Bcl-2 阳性的神经元在皮质结构的针道周围有所增加。定量的分析证明(图 2C),LPS 处理 2 d 后,皮质内 Bcl-2 阳性的神经细胞数目和密度与 PBS 注射的对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

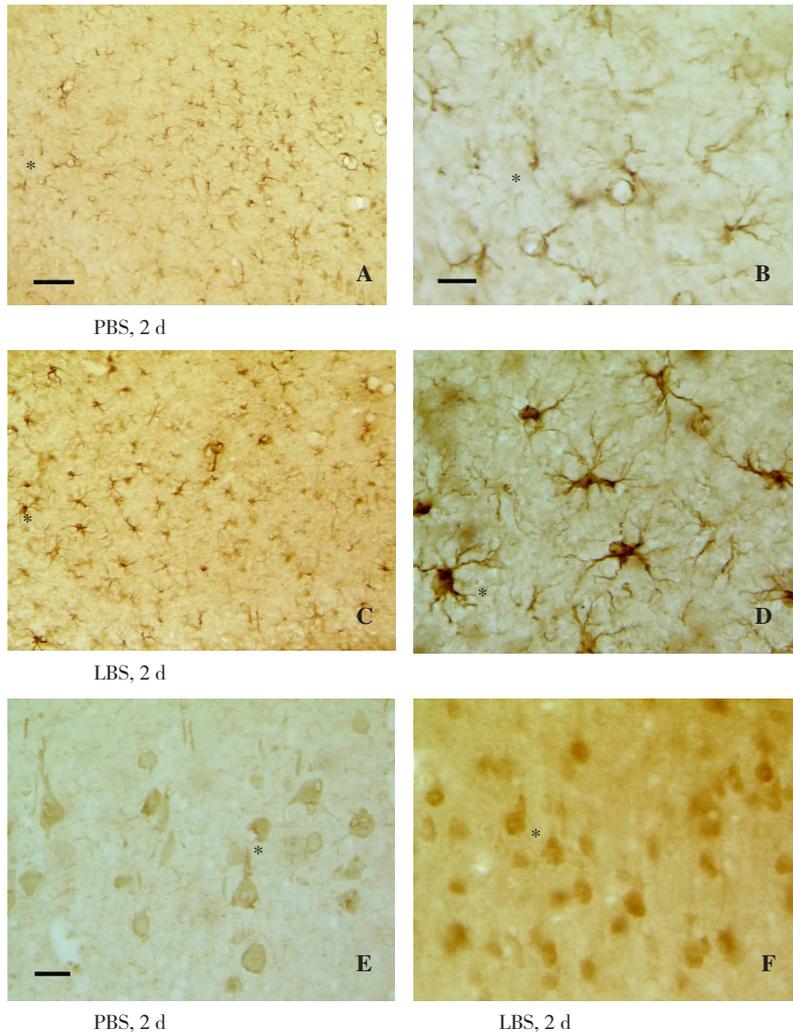


图 1 急性神经炎症动物模型小鼠脑 GFAP 和 Bcl-2 免疫组织化学染色 A 和 B:注射 PBS 2 d 后海马 CA3 区内 GFAP 免疫组织化学染色,* 所示 GFAP 阳性星形胶质细胞胞体小,突起细长;C 和 D:注射 LPS 2 d 后,海马 CA1 区内 GFAP 免疫组织化学染色,* 所示激活的 GFAP 阳性星形胶质细胞的胞体增大,突起肥大;E 和 F:分别注射 PBS 和 LPS 2 d 后,皮质内 Bcl-2 免疫组织化学染色,* 所示:Bcl-2 免疫反应产物位于胞质及突起内,呈棕色,胞核不显色。可见 LPS 处理后皮质内 Bcl-2 阳性神经细胞的免疫反应产物着色加深。Scale bars: A 和 C,bar = 25 μm ; B 和 D,bar = 10 μm ; E 和 F, bar = 20 μm

Fig. 1 GFAP and Bcl-2 immunohistochemistry staining in mouse brain in acute neuroinflammation animal mode A and B: GFAP immunoreactivity in the CA3 field of the hippocampus was observed at 2 days after PBS intracerebroventricular injection. The asterisks indicates that astrocytes consist of smaller cell bodies and thinner processes; C and D: GFAP immunoreactivity in the CA1 field of the hippocampus was observed at 2 days after LPS intracerebroventricular injection. The asterisks indicates that activated astrocytes exhibit hypertrophy of cell bodies and processes; E and F: Bcl-2-immunopositive cells were seen in the cortex. Bcl-2 staining consisted of brownish reaction products mostly localized in the cytoplasm and processes of the neurons. The staining of Bcl-2 immunoreactive products increased significantly in the cortex at 2 days after ICV LPS injection. Scale bars: A and C, bar = 25 μm ; B and D, bar = 10 μm ; E and F, bar = 20 μm

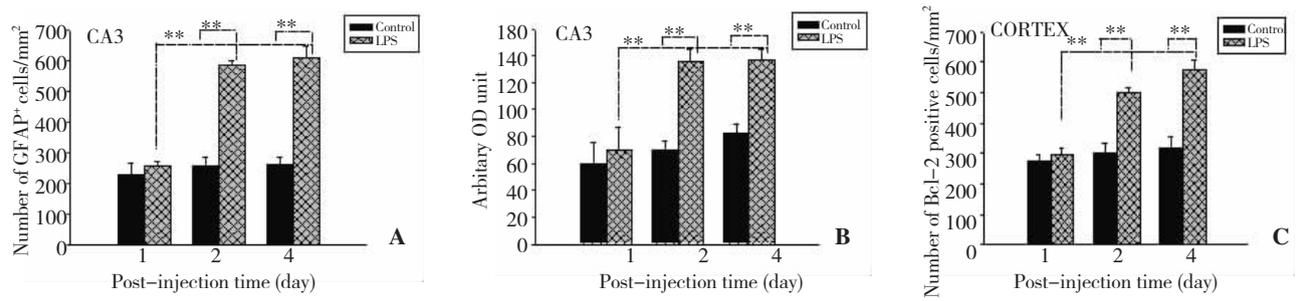


图2 急性神经炎症动物模型小鼠脑 GFAP 阳性星形胶质细胞和 Bcl-2 阳性神经元的定量分析 A 和 B: 分别注射 PBS 和 LPS 1, 2, 4 d 后, 小鼠海马 CA3 区内 GFAP 阳性星形胶质细胞的数目和染色密度的定量分析。与对照组比较, $** P \leq 0.01$; C: 分别注射 PBS 和 LPS 1, 2, 4 d 后, 小鼠皮质内 Bcl-2 阳性神经元数目的定量分析。与对照组比较, $** P \leq 0.01$

Fig. 2 Quantitative analysis of GFAP positive astrocytes and Bcl-2 positive neurons in mouse brain in acute neuroinflammation animal model A and B: The histograms illustrate the quantitative analysis (cell number for A and immunosignal intensity for B) of GFAP-positive astrocytes in the hippocampal CA3 field of mice at 1, 2 and 4 days following PBS and LPS treatment, respectively; C: The histogram illustrates the quantitative analysis (cell number) of Bcl-2 positive neurons in the cortex of mice at 1, 2 and 4 days following PBS and LPS treatment, respectively Compared with the control groups, $** P \leq 0.01$

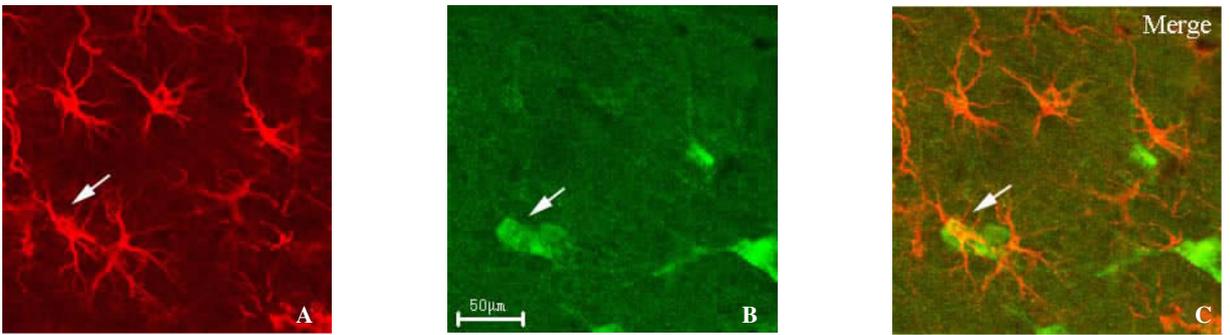


图3 GFAP 和 Bcl-2 免疫荧光双重标记染色 A: 为 LPS 注射 4 d 后的实验组海马 CA3 区内 GFAP 免疫荧光阳性的星形胶质细胞(红色); B: 为 CA3 区内 Bcl-2 免疫荧光阳性神经元(绿色); C: 在 CA3 区内未见 GFAP 和 Bcl-2 双标细胞, 可见 CA3 区内 GFAP 阳性星形胶质细胞和 Bcl-2 阳性神经元部分重叠(黄色)

Fig. 3 Double labeling for Bcl-2 and GFAP A: GFAP immunofluorescent positive astrocytes in CA3 at 4 days after ICV LPS administration (red); B: Bcl-2 immunofluorescent positive neurons (green); C: No immunofluorescent double labeling cells for GFAP and Bcl-2 were observed in the CA3, but merging GFAP immunofluorescent positive astrocytes and Bcl-2 immunofluorescent positive neurons were seen to be yellow

2.3 GFAP 和 Bcl-2 免疫荧光双标记染色 LPS 注射 4 d 后, GFAP 和 Bcl-2 免疫荧光双重标记染色切片显示, 在脑内没有发现 GFAP 和 Bcl-2 双标细胞, 即激活的星形胶质细胞不表达 Bcl-2, 但可见 GFAP 阳性星形胶质细胞和 Bcl-2 阳性神经元重叠。星形胶质细胞的突起可见于 Bcl-2 免疫荧光阳性神经元的鞘中(图 3 A, C)。

3 讨 论

本研究的主要发现是侧脑室内注射 LPS 后, 诱导星形胶质细胞的激活和神经元的激活, 星形胶质细胞 GFAP 表达增加和神经元的抗凋亡蛋白 Bcl-2 上调。LPS 诱导的星形胶质细胞的激活包括星形胶质细胞的形态改变, 细胞数量的增加, GFAP 蛋白质的表达增加, 用图像分析系统定量地分析, 表明其免疫反应性均增加。

有趣的是,LPS 诱导星形胶质细胞的激活恒定在脑室系统周围的脑实质,比如海马、隔区、纹状体、皮质及间脑的结构。另外,脑中一些部位,对于脑脊液中急性炎症导致星形胶质细胞的反应因部位不同而存在差异。临近背侧第三脑室的结构,海马内星形胶质细胞的反应尤其增强。

Buttini 等^[8]采用周围性给药(静脉注射法)及 Peng 等^[9]新近的研究发现,在大鼠脑室内注射丙种干扰素或者丙种干扰素与脂多糖或者肿瘤坏死因子- α 的混合物,外源性内毒素和前炎症细胞因子,除了引起神经胶质细胞激活与形态改变以外,还伴有主要组织相容性复合体 I 和 II 抗原表达的上调^[7]。这一变化可在注射后持续几天时间。神经胶质细胞参与中枢神经系统对中枢免疫刺激的调节。

星形胶质细胞的数目增加起因于祖先星形胶质细胞的增殖和/或者分化^[10-11]。炎症调质,包括肿瘤坏死因子- α ,能够诱导星形胶质细胞进行有丝分裂^[10]。增生活化的星形胶质细胞对神经元的有益或者有害作用一直存在争论:Raivich 等^[11]发现在神经变性疾病中,增生活化的星形胶质细胞可分泌神经营养因子,如碱性成纤维生长因子、脑源性生长因子、睫状神经营养因子,以及胶质细胞源性生长因子等,说明星形胶质细胞具有神经保护及修复作用。Brosnan 等^[12]研究发现,丙种干扰素和肿瘤坏死因子- α 能够诱导星形胶质细胞激活,然后迅速地合成大量的肿瘤坏死因子- α 细胞毒性物质和白细胞介素-6 等前炎症细胞因子,同时下调转移生长因子-beta 和白细胞介素-10,导致免疫炎症损伤;Munoz-Fernández 等^[13]研究发现激活的星形胶质细胞能够产生一氧化氮细胞毒性物质而导致组织的损伤。本实验侧脑室内注射 LPS 后,诱导星形胶质细胞的激活,GFAP 表达增加,同时,神经元内抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达上调,提示 LPS 诱导的急性神经炎症早期,激活的星形胶质细胞对于神经元具有保护作用。

机体在病理刺激或者超过生理限度的情况下,机体会产生保护性反应,例如,引起促进细胞存活的基因表达增加。Bcl-2 是 Bcl-2 家族成员之一,具有抗凋亡的作用。作为神经元活动状态的标记物,已被广泛采用。本实验发现 LPS 注射后 1d Bcl-2 出现表达,注射后 2d,皮质内的细胞数目和密度明显增加,4d 后为表达高峰。表明小鼠

脑的神经元对于中枢性免疫刺激的调节反应与星形胶质细胞的激活是同步的。而且,GFAP 和 Bcl-2 免疫荧光双重标记染色切片显示,在脑内没有发现 GFAP 和 Bcl-2 双标细胞,即激活的星形胶质细胞不表达 Bcl-2,但可见海马 CA3 区内 GFAP 阳性星形胶质细胞和 Bcl-2 阳性神经元重叠,星形胶质细胞的突起可见于 Bcl-2 免疫荧光阳性神经元的鞘中。表明两者之间有着密切的关系,为神经元与星形胶质细胞之间的信息交流提供了形态学支持。两种细胞的接触是相互作用的最重要因素,神经胶质细胞和神经元的相互作用所引起的功能变化有待进一步确定^[14]。LPS 诱导的急性神经炎症早期,脑室周围的脑实质星形胶质细胞和神经元的激活,可能参与脑内的免疫调节和保护性反应。Keller 等^[15]报道细胞因子 TNF- α 可以刺激某些残存的因子(如钙结合蛋白,Bcl-2 等蛋白质)的表达,通过其神经酰胺通路抑制某些自由基的产生,从而保护神经元免受损害。

LPS 是革兰阴性杆菌的细胞壁的主要成分,在免疫应答研究中常被作为一种多克隆免疫激发剂来模拟机体免疫激发状态,是研究免疫系统与神经系统之间信息交流的常用模型^[7]。目前建立实验性急性神经炎症的动物模型的方法主要有 2 种:周围性给药(腹腔注射,静脉注射 LPS)和中枢性给药(大脑脑室内注射 LPS)2 种途径,常因给药剂量的差异导致病变程度或损害范围的极大差异。例如,静脉注射法、注射不同浓度(1, 2.5 和 5 mg/kg. wt)的炎性刺激物后,神经胶质细胞的增殖,激活程度及激活的神经胶质细胞产生细胞因子的量有差异^[8,16]。神经元和胶质细胞混合培养,低剂量 LPS(0.01 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{kg. wt}$)未引起小胶质细胞形态改变,高剂量 LPS(> 500 $\mu\text{g}/\text{kg. wt}$)时,OX42-LI 小胶质细胞分支增粗,数量随 LPS 剂量的增加而增加^[16]。另外,不同剂量的炎性刺激物引起急性神经炎症的部位分布也有差异^[17]。LPS 可诱导黑质多巴胺能神经元变性甚至死亡并呈剂量依赖性^[18]。表明脑对 LPS 的免疫反应强度是与剂量相关的。本实验中枢性注射 LPS 剂量为 4 μL (50 ng/ μL)相当于 10 $\mu\text{g}/\text{kg. wt}$,LPS 能够直接进入脑脊液而达到直接作用于脑的目的。但不同剂量的 LPS 中枢性注射所引起的星形胶质细胞 GFAP 表达和神经元 Bcl-2 表达的变化,即剂量/反应(量效关系),有待进一步研究。

致谢 衷心感谢意大利维罗纳大学医学院形态学与生物学系 Marina Bentivoglio 以赠送试剂的形式与我系合作,以完成此研究。

参考文献:

- [1] Bezzi P, Volterra A. A neuron-glia signaling network in the active brain [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11(3): 387-394.
- [2] Acarin L, Gonzalez B, Castellano B. Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after excitotoxic lesion in the immature rat brain [J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(10): 3505-3520.
- [3] 宿长军, 段丽, 张辉, 等. 大鼠脑内星形胶质细胞对低血压的反应及其与神经元的关系 [J]. *解剖学报*, 2002, 33(1): 33-36.
- SU Chang-jun DUAN Li, ZHANG Hui, et al. Response of astrocytes to hypotension in rat and its relationship with neurons [J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2002, 33(11), 33-37.
- [4] Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, et al. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis [J]. *J Neurol Sci*, 2002, 202(1-2): 13-23.
- [5] Vehmas A, Kawas C, Stewart W, et al. Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2003, 24(2): 321-331.
- [6] Franklin K B J, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates [M]. San Diego: Academic Press, 1997: 1-78.
- [7] Kong G Y, Kristensson K, Bentivoglio M. Reaction of mouse brain oligodendrocytes and their precursors, astrocytes and microglia, to proinflammatory mediators circulating in the cerebrospinal fluid [J]. *Glia*, 2002, 37(3): 191-205.
- [8] Buttini M, Limonta S, Boddeke H W. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain [J]. *Neurochem Int*, 1995, 29(1): 25-35.
- [9] Peng Z C, Kristensson K, Bentivoglio M. Distribution and temporal regulation of the immune response in the rat brain to intracerebroventricular injection of interferon- γ [J]. *Exp Neurol*, 1998, 154(2): 403-417.
- [10] Norton W T, Aquino D A, Hozumi I, et al. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review [J]. *Neurochem Res*, 1992, 17(9): 877-885.
- [11] Dihné M, Block F, Korr H, et al. Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury [J]. *Brain Res*. 2001, 902(2): 178-189.
- [12] Brosnan C F, Raine C S. Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis [J]. *Brain Pathol*, 1996, 6(3): 243-257.
- [13] Munoz-Fernández M A, Fresno M. The role of tumour necrosis Factor- α , interleukin-6, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system [J]. *Prog Neurobiol*, 1998, 56(3): 307-340.
- [14] Zhang S C, Fedoroff S. Neuron-microglia interactions in vitro [J]. *Acta Neuropathol*, 1996, 91(4): 385-395.
- [15] Keller J N, Kindy M S, Holtsberg F W, et al. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction [J]. *J Neurosci*, 1998, 18(2): 687-697.
- [16] Quan N, Stern E L, Whiteside M B, et al. Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat [J]. *J Neuroimmunol*, 1999, 93(1-2): 72-80.
- [17] Chang R C, Chen W, Hudson P, et al. Neurons reduce glial responses to lipopolysaccharide (LPS) and prevent injury of microglial cells from over-activation by LPS [J]. *J Neurochem*, 2001, 76(4): 1042-1049.
- [18] 黎钢, 孙圣刚, 曹学兵, 等. 脂多糖诱发大鼠黑质多巴胺能神经元变性 [J]. *中国康复*, 2003, 18(2): 67-69.
- LI Gang, SUN Sheng-gang, CAO Xue-bing, et al. Degeneration of substantial nigral dopaminergic neurons induced by lipopolysaccharide [J]. *Chin J Rehabilitation*, 2003, 18(2): 67-69.

(本文编辑 傅希文)