

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.01370

系统性炎症对糖尿病小鼠基底节损害的影响及机制

王静华, 周胜利, 毛玲娜, 王贵锋, 宋震亚*

浙江大学医学院附属第二医院全科医学科, 杭州 310009

[摘要] **目的** 研究系统性炎症对糖尿病小鼠基底节血脑屏障(BBB)破坏、炎性细胞活化和神经元变性的影响及机制。

方法 腹腔注射链脲佐菌素制备糖尿病小鼠模型, 利用脂多糖(LPS)建立系统性炎症模型, 分为糖尿病组、糖尿病+LPS组和对照组。免疫荧光染色检测基底节小胶质细胞、星形胶质细胞活化情况及 BBB 紧密连接蛋白 Occludin 表达水平; 甲苯胺蓝染色检测神经元变性情况; 明胶底物凝胶酶谱法检测基质金属蛋白酶(MMPs)活性。**结果** 与对照组小鼠相比, 糖尿病组小鼠基底节神经元的数量减少($P < 0.01$), 小胶质细胞和星形胶质细胞活化数量增加($P < 0.01$); 而糖尿病+LPS组小鼠基底节神经元数量进一步减少, 小胶质细胞和星形胶质细胞活化数量均增加, 与糖尿病组相比差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。糖尿病组小鼠 MMP-9 较对照组明显活化, 而糖尿病+LPS组小鼠 MMP-9 较糖尿病组明显活化($P < 0.05$); 3组 MMP-2 活性差异无统计学意义。糖尿病组小鼠脑内基底节 Occludin 表达较对照组减少, 而糖尿病+LPS组小鼠基底节 Occludin 表达减少更明显。**结论** 高血糖可以导致基底节炎性细胞活化、BBB 破坏和神经元变性, 而系统性炎症加重这一病理过程。

[关键词] 糖尿病; 系统性炎症; 基底节变性; 小胶质细胞; 血脑屏障

[中图分类号] R 587.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)12-1370-04

Effects of systemic inflammation on basal ganglia damage in diabetic mice and the underlying mechanisms

WANG Jing-hua, ZHOU Sheng-li, MAO Ling-na, WANG Gui-feng, SONG Zhen-ya*

Department of General Practice, The Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, Zhejiang, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of systemic inflammation on the damage of blood brain barrier (BBB), innate immune cell activation and neuronal degeneration in basal ganglia of diabetic mice and the related mechanisms. **Methods** Diabetic mouse model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin. The system inflammation was induced by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). The mice were divided into diabetic group, diabetic plus LPS group and control group. The activation of microglia and astrocyte in the area of basal ganglia and protein expression of Occludin in BBB were detected by immunofluorescence. Neuronal degeneration was detected by toluidine blue staining, and matrix metalloproteinase (MMPs) activity was detected by gelatin substrate gel zymography. **Results** Compared with control group, the number of neurons in the basal ganglia was significantly decreased in the diabetic group ($P < 0.01$) and the number of active microglia was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the diabetic group, the diabetic plus LPS group had significantly decreased neurons in the basal ganglia and significantly increased active microglia and astrocytes ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). MMP-9 was significantly activated in diabetic group compared with that in the control group, and that in the diabetic plus LPS group was significantly activated compared with that in the diabetic group ($P < 0.05$). However, the MMP-2 activities were not significantly different among the three groups. Occludin expression in the basal ganglia was decreased in the diabetic group compared with control group, and a more greater decrease was found in diabetic plus LPS group. **Conclusion** Hyperglycemia can lead to inflammatory cell activation in the basal ganglia, BBB damage and neuronal degeneration in mice; and systemic inflammation can aggravate the pathological process in the basal ganglia.

[Key words] diabetes mellitus; systemic inflammation; basal ganglia degeneration; microglia cells; blood-brain barrier

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(12):1370-1373]

[收稿日期] 2015-08-04 **[接受日期]** 2015-10-21

[基金项目] 浙江省自然科学基金(LY12H09008). Supported by Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY12H09008).

[作者简介] 王静华, 博士, 副主任医师. E-mail: wang.jinghua@live.cn

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0571-87784679, E-mail: songzy@medmail.com.cn

非酮症糖尿病性偏侧舞蹈病 (hemichorea associated with nonketotic hyperglycemia, HC-NH) 是一种罕见的非酮症高血糖并发症, 目前发病机制不明。该病多见于老年女性, 尤其是亚洲人, 临床上以急性起病的偏侧肢体的大幅度、不规则的不自主运动为主要症状, MRI 检查显示病灶局限于壳核和尾状核, 尸检和脑组织活检发现胶质细胞增生和空泡形成或肥大星形细胞增生^[1]。我们曾报道 3 例患者病灶存在明显的强化效应, 提示血脑屏障 (BBB) 破坏; 患者发病前均有感染病史, 脑脊液检查显示非特异性炎性反应, 提示炎性反应参与高血糖导致的基底节损害^[2]。研究系统性炎性反应和高血糖两者对中枢神经系统损害及其机制, 对防治糖尿病并发症具有重要意义。因此, 本研究利用脂多糖 (LPS) 建立系统性炎症反应模型, 研究系统性炎症对糖尿病小鼠基底节神经元的损害作用, 并探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型及分组 选用 4~5 个月龄 C57BL/6 雄性小鼠, 体质量 30~40 g, 均购自浙江省医学科学院实验动物中心 [许可证号 SCXK (浙) 2013-0033]。动物模型实验设计符合动物管理委员会和 NIH 指南。48 只小鼠按照完全随机化方式分为 3 组: 空白对照组、糖尿病组和糖尿病 + LPS 组, 每组 16 只。糖尿病模型制作: 小鼠腹腔注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, Sigma 公司) 150 mg/kg, 注射后检测血糖证实出现糖尿病, 即空腹血糖 > 20 mmol/L 入选实验动物, 空腹血糖未达标者予以剔除并补充。糖尿病 + LPS 组以 100 μ g/kg 剂量腹腔注射 LPS (Sigma 公司)。实验过程中糖尿病组死亡 1 只, 糖尿病 + LPS 组死亡 2 只, 及时补充。空白对照组腹腔注射同等剂量的 0.9% 生理盐水。动物常规饮食饲养, 72 h 后灌注、取脑。

1.2 免疫荧光染色及甲苯胺蓝染色 脑组织复合甲醛固定 4 $^{\circ}$ C 过夜, 20%、30% 和 40% 蔗糖依次脱水, 冰冻切片机冰冻切片 (30 μ m), 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。取出脑组织切片, PBS 洗涤 2 次; 加羊血清, 封闭 60 min; 然后加一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗涤 3 次, 加荧光结合 Cy3 抗鼠或 488 抗羊抗体, 避光室温孵育 60 min; 避光, PBS 洗涤 3 次, 贴片封片, 荧光显微镜

下观察、摄片。抗体血脑屏障紧密连接蛋白 Occludin (1:500, Sigma), 检测 Occludin 在小鼠基底节区的表达; Iba-1 (1:500, Wako Chemicals) 标记小胶质细胞, GFAP (1:500, Sigma) 标记星形胶质细胞。镜下观察细胞形态, 计数每个视野阳性细胞。

另取脑组织切片在 1% 甲苯胺蓝溶液中浸泡 5 min, 蒸馏水轻轻冲洗 3~5 min, 分别以 75%、95%、100% 的乙醇逐级脱水后, 二甲苯透明, 中性树脂胶封固后甲苯胺蓝染色神经元。

1.3 明胶凝胶酶谱法测定基质金属蛋白酶 (MMP)-2 和 MMP-9 活性 脑组织加裂解缓冲液, 超声匀浆, 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min (10 000 rpm), 提取上清液总蛋白, 应用 Gelatine-Sepharose 4B (Amersham, GE healthcare, Munchen, Germany) 吸附纯化 MMPs; 明胶酶谱法凝胶电泳。凝胶在含 2.5% Triton X-100 洗涤缓冲液下孵育, 然后在孵育缓冲液中 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 用 Coomassie 蓝 R-250 染色 30 min 后, 凝胶用 5% 醋酸和 25% 甲醇脱色至清晰条带显现, 在蓝色背景上显示明胶分解。混合鼠 MMP-2 和 MMP-9 标准品作为阳性对照。用 Image J 灰度半定量测定 MMP-2 和 MMP-9 活性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理, 计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较方差齐性时采用 LSD 法, 方差不齐时采用 Dunnett' C 法作多重比较。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 系统性炎症导致基底节神经元变性和小胶质细胞及星形胶质细胞活化 对照组小鼠基底节神经元数量为 71.05 ± 2.06 , 糖尿病组为 58.07 ± 4.67 , 较对照组减少 ($P=0.00097$); 而糖尿病 + LPS 组小鼠基底节神经元数量为 41.30 ± 1.99 , 较糖尿病组减少, 两组差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。糖尿病组小鼠小胶质细胞明显活化, 细胞体变大, 突触增大 (图 1), 活化小胶质细胞数量为 48.21 ± 6.56 , 与对照组 (11.95 ± 1.57) 相比差异有统计学意义 ($P<0.01$); 糖尿病 + LPS 组小鼠小胶质细胞活化更加明显, 细胞呈阿米巴样改变, 活化小胶质细胞数为 56.83 ± 4.07 , 与糖尿病组相比差异有统计学意义 ($P=0.021$, 图 1)。对照组小鼠基底节活化星形胶质细胞数量为 $5.95 \pm$

1. 41, 糖尿病组为 64.60 ± 3.30 , 两组差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而糖尿病 + LPS 组小鼠活化星形胶质

细胞数量为 72.85 ± 1.80 , 与糖尿病组相比差异有统计学意义 ($P = 0.00072$, 图 1)。

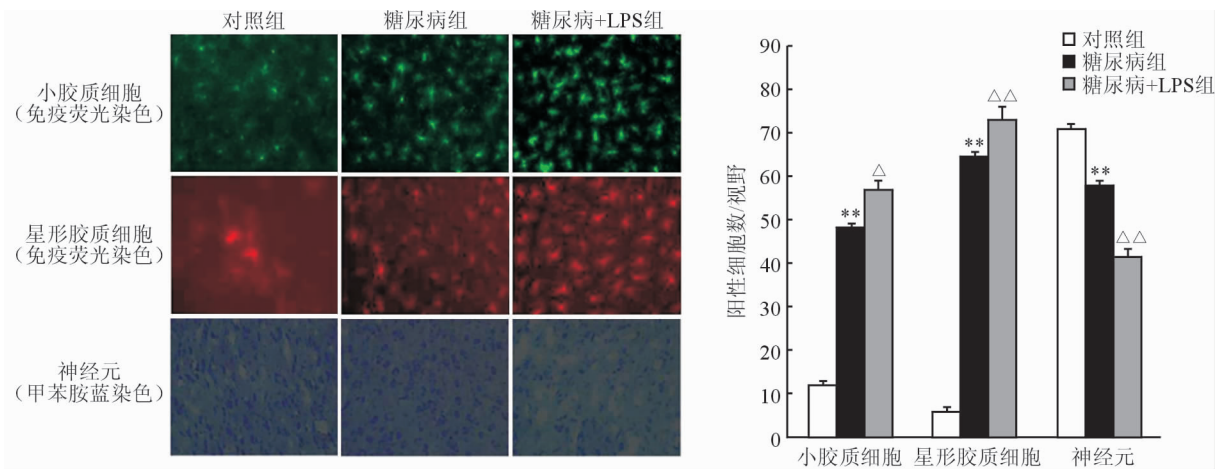


图 1 各组小鼠小胶质细胞、星形胶质细胞及神经元形态学和定量比较

免疫荧光染色 (Original magnification: $\times 300$) 和甲苯胺蓝染色 (Original magnification: $\times 200$). LPS: 脂多糖. ** $P < 0.01$ 与对照组比较; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 与糖尿病组比较. 小胶质细胞: $n = 5$; 星形胶质细胞: $n = 5$; 神经元: $n = 6$. $\bar{x} \pm s$

2. 2 系统性炎症导致 MMP-9 活化和 Occludin 破坏 明胶底物凝胶酶谱法检测小鼠脑组织 MMP-2 和 MMP-9 活性, 结果显示糖尿病组和糖尿病 + LPS 组小鼠 MMP-9 较对照组明显活化, 糖尿病组小鼠 MMP-9 活性为 8.52 ± 1.85 , 糖尿病 + LPS 组为 14.69 ± 1.02 , 两组差异有统计学意义 ($P = 0.0256$). 而糖尿病与糖尿病 + LPS 组两组 MMP-2 活性差异没有统计学意义 ($P = 0.945$, 图 2)。

组小鼠基底节 Occludin 表达减少更加明显 (图 3C)。

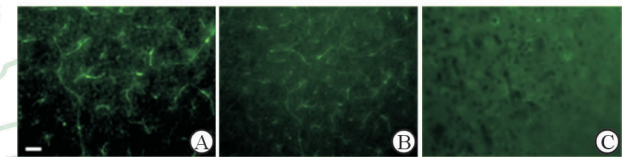


图 3 免疫荧光检测 BBB 紧密连接蛋白 Occludin 在小鼠基底节区表达情况

A: 对照组; B: 糖尿病组; C: 糖尿病 + LPS 组. LPS: 脂多糖; BBB: 血脑屏障. Bar = $30 \mu\text{m}$

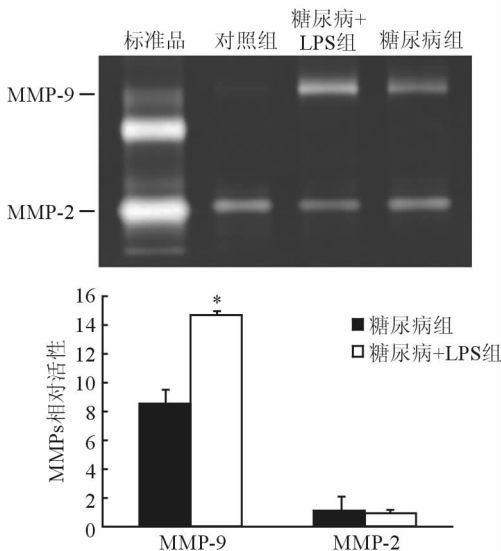


图 2 明胶底物凝胶酶谱法检测 MMP-2、MMP-9 活性

LPS: 脂多糖; MMP: 基质金属蛋白酶. * $P < 0.05$ 与糖尿病组比较. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

免疫荧光染色结果显示对照组小鼠脑组织 Occludin 在基底节沿微血管处表达 (图 3A), 糖尿病组小鼠 Occludin 表达减少 (图 3B), 而糖尿病 + LPS

3 讨论

BBB 是维持脑内环境稳定的重要结构, 近年来研究发现 BBB 是一个动态的过程, 维持和调节脑部平衡和代偿系统循环波动, 并增加脑内代谢功能. 一些中枢神经系统疾病, 如阿尔茨海默病、帕金森病、癫痫、卒中等多种疾病, 能破坏 BBB 结构完整性, 导致神经变性^[3-4]. 钆增强 MRI 和 CT 灌注扫描显示糖尿病患者 BBB 通透性增加^[5], 提示高血糖可以导致 BBB 破坏. 高血糖导致 BBB 损害各个部位并不一致, 中脑最先受累, 而后是海马、皮质和基底节^[6]. 这种区域变化表明 BBB 不是完全统一的屏障, 而是通过复杂的全脑和局部因素来调节的. Occludin 主要表达于中枢神经系统内皮细胞^[7], 本研究显示高血糖时 Occludin 表达明显减少, 糖尿病小鼠基底节神经元变性, 数量减少, 提示糖尿病时存在 BBB 损害, 可能参与继发性基底节神经元变性. MMPs 能够降解毛细管基膜和紧密连接蛋白, 导致 BBB 损害, 以往研究证实 MMPs 激活是 BBB 破坏

的关键因素^[8]。本研究显示高血糖通过活化 MMP-9 参与 BBB 损伤;此外,高血糖还可以激活小胶质细胞和星形胶质细胞,这些激活的炎性细胞形态发生改变,并可分泌多种细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白介素 1(IL-1)等;这些细胞因子又可激活小胶质细胞,形成“病理级联”,使其释放大炎症因子致使神经元变性^[9]。

系统性炎症反应可以加剧中枢神经变性。临床观察发现系统性感染和应激,如急性败血症和手术可能导致老年患者持久性认知功能和运动功能的减退^[10]。Huh 等^[11]研究发现,中脑黑质区域对炎性介导的神经变性过程较为敏感,小胶质细胞的激活发生在帕金森病发生、发展的各个阶段中,较其他神经变性疾病有更为重要的作用。基底节小胶质细胞对炎症反应非常敏感,立体定向注射 LPS 至黑质或纹状体内,可以导致小胶质细胞活化和多巴胺神经元变性,促炎性细胞因子如 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 等表达增高,并表现类似帕金森病的症状^[12]。最近研究也证实 LPS 诱导的系统性炎症可以导致小胶质细胞活化和多巴胺能神经元变性^[13]。本实验结果显示,LPS 诱导系统性炎症时,糖尿病小鼠基底节小胶质细胞活化数量明显增加,MMP-9 活性也显著增加,而 Occludin 表达进一步减少,表明系统性炎症可能通过激活 MMP-9、破坏 BBB、加重高血糖导致基底节病理损伤过程。

综上所述,本研究证实高血糖可以激活基底节小胶质细胞和星形胶质细胞,活化 MMP-9,引起 BBB 破坏,导致基底节神经元变性。而系统性炎症可以加重这一病理过程,提示一些可治的炎症因素参与基底节神经元变性,抑制过度的神经炎症反应可能有助于保护 BBB 和防止中枢神经系统损害,为糖尿病患者中枢神经系统并发症和神经变性疾病的防治提供新的方法。

[参考文献]

[1] Oh S H, Lee K Y, Im J H, Lee M S. Chorea associated with non-ketotic hyperglycemia and hyperintensity basal ganglia lesion on T₁-weighted brain MRI study: a meta analysis of 53 cases including four present cases[J]. J Neurol Sci, 2002, 200(1-2): 57-62.

[2] Wang J H, Wu T, Deng B Q, Zhang Y W, Zhang P, Wang Z K. Hemichorea-hemiballismus associated with nonketotic hyperglycemia: a possible role of inflammation[J]. J Neurol Sci, 2009, 284(1-2): 198-

202.

[3] Tajes M, Ramos-Fernández E, Weng-Jiang X, Bosch-Morató M, Guivernau B, Eraso-Pichot A, et al. The blood-brain barrier: structure, function and therapeutic approaches to cross it[J]. Mol Membr Biol, 2014, 31: 152-167.

[4] Montagne A, Barnes S R, Sweeney M D, Halliday M R, Sagare A P, Zhao Z, et al. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus [J]. Neuron, 2015, 85: 296-302.

[5] Iwata A, Koike F, Arasaki K, Tamaki M. Blood brain barrier destruction in hyperglycemic chorea in a patient with poorly controlled diabetes [J]. J Neurol Sci, 1999, 163: 90-93.

[6] Bartels A L, Kortekaas R, Bart J, Willemsen A T, de Klerk O L, de Vries J J, et al. Blood-brain barrier P-glycoprotein function decreases in specific brain regions with aging: a possible role in progressive neurodegeneration [J]. Neurobiol Aging, 2009, 30: 1818-1824.

[7] Richard D. The blood-brain barrier in health and disease[J]. Ann Neurol, 2012, 72: 648-672.

[8] Birgit O, Daneman R, Ransohoff R M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier [J]. Nat Med, 2013, 19: 1584-1596.

[9] Levesque S, Wilson B, Gregoria V, Thorpe L B, Dallas S, Polikov V S, et al. Reactive microgliosis: extracellular micro-calpain and microglia-mediated dopaminergic neurotoxicity [J]. Brain, 2010, 133 (Pt 3): 808-821.

[10] Iwashyna T J, Ely E W, Smith D M, Langa K M. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis [J]. JAMA, 2010, 304: 1787-1794.

[11] Huh S H, Chung Y C, Piao Y, Jin M Y, Son H J, Yoon N S, et al. Ethyl pyruvate rescues nigrostriatal dopaminergic neurons by regulating glial activation in a mouse model of Parkinson's disease [J]. J Immunol, 2011, 187: 960-969.

[12] Liu M, Bing G. Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease [J]. Parkinsons Dis, 2011, 2011: 327089.

[13] Bodea L G, Wang Y, Linnartz-Gerlach B, Kopatz J, Sinkkonen L, Musgrove R, et al. Neurodegeneration by activation of the microglial complement-phagosome pathway [J]. J Neurosci, 2014, 34: 8546-8556.