

神经节苷脂 GM1 对 D-半乳糖致衰老模型小鼠 脑海马区神经发生的保护作用*

刘雁勇¹ 张卿¹ 杨楠¹ 蔡哲² 左萍萍^{1,3}

摘要 目的:观察神经节苷脂 GM1 对 D-半乳糖致衰老模型小鼠脑海马神经发生的保护作用。**方法:**建立了 D-半乳糖小鼠致衰老模型,采用免疫组织化学方法观察 GM1 干预对海马神经前体细胞的增殖、存活和神经元分化的作用。**结果:**在模型鼠海马 DG 区的颗粒细胞和 CA1、CA3 区可观察到锥形神经元的死亡, TUNEL 阳性细胞位于神经前体细胞所在的颗粒细胞层和门区的交界处。GM1 干预后明显保护海马区新生细胞的增殖和生存。**结论:**GM1 通过对抗 D-半乳糖导致的细胞凋亡和促进海马神经发生的途径发挥其延缓衰老的作用。

关键词 D-半乳糖; 神经节苷脂 GM1; 海马; 神经发生

中图分类号:R493,R741 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2007)-07-0598-03

The protective effect of ganglioside GM1 on the hippocampal neurogenesis in D-galactose induced mice ageing model/LIU Yanyong, ZHANG Qing, YANG Nan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(7):589—591

Abstract Objective:To observe the protective effect of ganglioside GM1 on hippocampal neurogenesis. **Method:**An established model of ageing in mice was established and immunostaining techniques was adopted to study the effect of GM1 on the proliferation, long-term survival and neuronal differentiation of hippocampal progenitors that had been injured by D-galactose. **Result:**D-galactose induced neuronal injury and reduced neurogenesis in hippocampal CA1, CA3 and DG subfields. TUNEL-positive neurons distributed in the juncture between granular cell layer and hilus, where neural progenitor cells exist. GM1 treatment significantly increased the proliferation and long-term survival of hippocampal progenitor cell. **Conclusion:**GM1 can exert anti-ageing effect through promoting hippocampal neurogenesis.

Author's address Department of Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing, 100005

Key words D-galactose; Ganglioside GM1; Hippocampal; neurogenesis

成年哺乳动物包括人类脑中普遍存在着神经发生^[1-2]。海马脑区的神经发生是由位于齿状回颗粒下区(subgranular zone, SGZ)的前体细胞驱动的。SGZ 区的细胞迁移一段短的距离到达颗粒细胞层分化成新的颗粒细胞^[2]。SGZ 的神经发生能力随着年龄进程而下降,持续的神经元丢失,同时神经发生障碍,不能产生新的神经元,最终导致了学习记忆能力下降及其他退行性疾病的发生。因而,促进神经发生是治疗与年龄相关的认知功能下降的一个新的治疗策略^[3-7]。研究表明,D-半乳糖能够通过诱导神经损伤而模拟正常衰老啮齿动物的脑内变化。这些变化包括记忆损伤、自由基产生增加、抗氧化酶活性和免疫应答下降^[8-10]。GM1(monosialonganglioside)亦称单唾液酸四己糖神经节苷脂,在脑内含量丰富,主要位于髓鞘、神经元细胞膜和轴突。在病理过程如缺血、缺氧中常伴有脑内 GM1 含量下降和神经细胞受损,补充一定量的 GM1 后发现其具有类神经营养因子

的作用,可防止损伤造成的神经元的凋亡,增强突触的可塑性,改善学习记忆^[11]。本实验从脑海马区神经发生的角度观察 GM1 的抗衰老及神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 C57BL/6 小鼠,26—30g,8 周龄,共 45 只,由中国医学科学院动物研究所提供。明暗光照 12h/12h,自由进食饮水。

* 基金项目:国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2003AA215181)

1 中国医学科学院基础医学研究所,中国协和医科大学基础医学院药理室,北京,100005

2 中日友好医院临床医学研究所免疫学教研室

3 通讯作者:左萍萍(中国医学科学院基础医学研究所,北京东单三条五号,北京,100005)

作者简介:刘雁勇,男,博士,助理研究员

收稿日期:2007-05-22

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组:小鼠在适应环境 3d 后随机分成 3 组, 每组 15 只。正常对照组:皮下和腹腔注射生理盐水; 衰老模型组:皮下注射 D-半乳糖(100mg/kg, Sigma, St Louis, Missouri, USA), 腹腔注射生理盐水; 治疗组:皮下注射 D-半乳糖 100mg/kg, 腹腔注射 GM1 (30mg/kg, TRB Pharma S.A., Argentina)。D-半乳糖连续注射 7 周制备衰老模型, 从造模第 4 周开始进行 GM1 治疗。

1.2.2 BrdU 标记:5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(BrdU, Sigma 公司)被用来标记体内的神经前体细胞。每组 10 只小鼠在处死前 48h 开始腹腔注射 BrdU, 50mg/kg, 连续 3 次, 间隔 8h。每组 5 只在末次注射 BrdU 24h 后处死, 另外 5 只继续接受各种处理 1 周后, 在末次注射 BrdU 4 周后处死。

1.2.3 脑组织处理:小鼠 0.6%戊巴比妥钠深度麻醉, 进行灌注。取脑后置 4%多聚甲醛中 4℃过夜。然后转入 30%蔗糖中, 4℃存放。冰冻切片机切取冠状脑片, 片厚 40μm, 收集于标本保护剂中, -20℃保存, 用于 BrdU 免疫组织化学染色和双标荧光染色。另外每组 5 只小鼠灌注去脑后, 进行石蜡包埋, 切片厚度为 5mm, 用于 HE 染色、TUNEL 染色。

1.2.4 TUNEL 染色:切片用 20μg/ml 蛋白酶 K, 37℃消化 10min, 加入 3%H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶。洗片, 加入标记缓冲液(含 200U/ml TdT, 1mM DIG-dUTP)。37℃标记 2h, 洗片, 加入生物素化-抗地高辛抗体, 37℃反应 60min, 使用 BCIP/NBT 显色。

1.2.5 BrdU 免疫组织化学染色:切片用 50% formamide/2×SSC 预处理, 然后用 2M 盐酸, 37℃, 孵育 15 min。切片用 5%马血清-0.3%TritonX-100-TBS, 室温封闭 2h。加鼠抗 BrdU (1:1000, Sigma 公司), 4℃, 过夜。3 次洗片后, 与生物素化马抗小鼠 IgG(1:100), 室温孵育 2h。加入亲和素-生物素-过氧化物酶复合物, 孵育 1h, DAB 显色。

1.2.6 阳性细胞计数方法:40 倍物镜下计数海马两侧各区阳性细胞数, 每只动物计数 6—8 张切片取平均值。用 C-CCD 系统采集照片, 计算 DG 区(包括 GCL、SGZ 和门区)的面积, 以每平方毫米面积的阳性细胞数表示。

1.3 统计学分析

结果用均数±标准误表示, 组间比较采用单因素方差分析及多重比较检验。

2 结果

2.1 GM1 保护衰老模型小鼠海马的神经细胞

采用 HE 染色和 TUNEL 染色的方法来评价小鼠海马区神经细胞受损伤的情况。HE 染色切片观察到模型组小鼠 DG、CA1 和 CA3 区均有损伤的神经细胞, 表现为胞浆深染, 胞核浓染皱缩; TUNEL 染色(图 1, 见前置彩色插页 8)可见模型组各区的阳性细胞明显增多, 表现为蓝色深染的细胞核, 这些 TUNEL 阳性细胞不仅位于 DG 区的颗粒细胞层, 还有一部分位于或靠近颗粒细胞层和门区之间的交界处, 这里是神经前体细胞增殖迁移的地方。GM1 治疗组 HE 染色和 TUNEL 染色均未见明显的细胞损伤。

对 TUNEL 阳性细胞计数后发现, 模型组小鼠 DG、CA1 和 CA3 区的阳性细胞数均明显增加(表 1), 与对照组相比有显著性差异($P<0.05$); GM1 用药组在这三个区域内的阳性细胞数明显减少, 与模型组相比有显著性差异($P<0.05$)。说明连续注射 7 周的 D-半乳糖会引起小鼠脑内海马区神经细胞的死亡, 而 GM1 治疗 4 周后可见明显的保护作用, 死亡细胞显著减少。

2.2 GM1 保护衰老模型小鼠海马神经前体细胞的增殖

末次注射 BrdU 24h 后 BrdU 阳性细胞数代表了神经前体细胞的增殖能力。BrdU 免疫组织化学染色显示 DG 区的 BrdU 阳性细胞位于颗粒细胞层和门区交界的 SGZ 区, 且核形不规则, 成簇存在(图 2, 见前置彩色插页 8); CA1 和 CA3 区散布着零星的 BrdU 阳性细胞, 数目明显少于 DG 区(图 3, 见前置彩色插页 8)。

计数后进行统计分析发现, 模型组小鼠 DG、CA1 和 CA3 区的阳性细胞数明显减少(表 2), 与对照组相比有显著性差异($P<0.05$); GM1 用药组在这三个区域内的阳性细胞数明显增加, 与模型组相比有显著性差异($P<0.05$)。说明 D-半乳糖会引起小鼠脑内海马区神经前体细胞增殖能力的降低, 而 GM1 能够保护细胞的增殖能力, 使其能够基本维持在正常水平。

2.3 GM1 保护衰老模型小鼠海马神经前体细胞的长期生存

末次注射 BrdU 后继续给予药物处理 1 周, 在 BrdU 标记后 4 周处死动物, 用以观察 D-半乳糖和 GM1 对神经前体细胞长期生存能力的影响。此时的 BrdU 阳性细胞明显减少, 计数后进行统计分析发现, 模型组小鼠 DG 区的阳性细胞数明显减少, 与对照组相比有显著性差异($P<0.05$); GM1 用药组的阳性细胞数明显增加, 与模型组相比有显著性差异

($P<0.05$)(表 3)。说明 GM1 能够保护由 D-半乳糖损伤的新生细胞,维持其长期存活。

表 1 各组小鼠海马 DG、CA1 和 CA3 区 TUNEL 阳性细胞的计数分析 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	DG 区	CA1 区	CA3 区
对照组	5	6.533 $\pm$ 1.602	4.35 $\pm$ 0.773	3.75 $\pm$ 1.419
D-半乳糖组	5	30.854 $\pm$ 4.000 ^①	21.633 $\pm$ 2.114 ^①	26.195 $\pm$ 3.067 ^①
D-半乳糖+GM1 组	5	13.759 $\pm$ 1.485 ^②	13.425 $\pm$ 1.053 ^②	15.716 $\pm$ 1.634 ^②

①与对照组比 $P<0.05$;②与模型组比 $P<0.05$

表 2 末次注射 BrdU24h 后各组小鼠海马 DG、CA1 和 CA3 区 BrdU 阳性细胞的计数分析 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	DG 区	CA1 区	CA3 区
对照组	5	108.516 $\pm$ 4.552	8.875 $\pm$ 0.904	2.256 $\pm$ 0.128
D-半乳糖组	5	85.288 $\pm$ 8.173 ^①	4.179 $\pm$ 0.232 ^①	1.354 $\pm$ 0.575 ^①
D-半乳糖+GM1 组	5	106.296 $\pm$ 7.782 ^②	8.568 $\pm$ 0.436 ^②	2.373 $\pm$ 0.217 ^②

①与对照组比 $P<0.05$;②与模型组比 $P<0.05$

表 3 末次注射 BrdU 4 周后各组小鼠海马 DG 区 BrdU 阳性细胞的计数分析 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	DG 区
对照组	5	21.156 $\pm$ 1.730
D-半乳糖组	5	8.860 $\pm$ 1.386 ^①
D-半乳糖+GM1 组	5	20.780 $\pm$ 2.177 ^②

①与对照组比 $P<0.05$;②与模型组比 $P<0.01$

3 讨论

在本次实验中,我们设计用 D-半乳糖制作衰老模型小鼠,探讨其脑内神经发生下降的机制和 GM1 的保护作用。衰老是一个复杂的过程,受许多生理、病理因素的影响,其中“衰老的自由基理论”是目前比较公认的^[10]。D-半乳糖可以诱导成年小鼠出现类似正常衰老动物的病理改变,如寿命缩短、认知功能障碍、运动和免疫能力下降,以及生化指标的改变,被广泛用于衰老机制的研究和抗衰老药物的筛选^[11]。我们的实验结果发现 D-半乳糖不仅损伤成熟的海马神经元,而且损伤海马的神经发生,导致神经前体细胞的增殖能力和长期生存能力均下降,这与正常衰老小鼠脑内神经发生的变化相类似。

持续增加的活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS)是凋亡的诱导剂,而凋亡又是衰老和与衰老相关的神经退行性疾病中神经元丢失的主要原因^[12]。在 D-半乳糖注射的小鼠海马区,我们不仅观察到成熟的 DG 区的颗粒细胞和 CA1、CA3 区的锥形神经元的死亡,同时还发现在 DG 区部分 TUNEL 阳性细胞位于颗粒细胞层和门区的交界处,即神经前体细胞的位置,可见新生细胞和成熟神经元一样容易遭受 ROS 的伤害。海马 BrdU 阳性细胞的计数结果进一步证实了此结论。BrdU 染色可见阳性细胞主要位于 DG 区的 SGZ,零星分布于 CA1、CA3 区,CA1、CA3 区的阳性细胞分别由侧脑室、DG 区的前体细胞迁移而来。D-半乳糖连续注射 7 周

后,这三个区域的 BrdU 阳性细胞明显减少,而且 DG 区新生细胞的长期生存能力也明显降低,这与照射 X 线、过多摄入酒精、给予 A β 淀粉样肽后 ROS 产生增加,最终抑制神经发生结果相一致^[13]。这些研究从神经发生的角度进一步支持了衰老的“自由基理论”。总之,神经发生障碍,神经元持续性丢失,造成了 D-半乳糖引起的海马相关的学习记忆功能的减退。GM1 具有很强的抗氧化作用,以前的实验证实外源性 GM1 能够降低谷氨酸诱导的神经细胞中的自由基反应;减少 Fe²⁺-H₂O₂ 系统中 ROS 的产生;降低大脑皮质突触体内脂质过氧化产物的积聚;保护 Na⁺, K⁺-ATPase 的活性,避免 ROS 引起的酶失活;调控细胞内的 Ca²⁺浓度,避免 ROS 引起的钙超载。这可能是 GM1 促进神经发生,维持其存活的可能机制。

我们的实验从神经发生的角度证明了:GM1 不仅能够保护 D-半乳糖衰老小鼠海马的神经前体细胞,还能够促进海马新生细胞的长期存活。提示 GM1 可能通过促进神经发生来延缓衰老的进程。

参考文献

- [1] Gage FH. Mammalian neural stem cells [J]. Science, 2000, 287: 1433—1438.
- [2] Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus [J]. Nat Med, 1998, 4: 1313—1317.
- [3] Gould E, Beylin A, Tanapat P, et al. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation [J]. Nat Neurosci, 1999, 2: 260—265.
- [4] Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment [J]. Nature, 1997, 386: 493—495.
- [5] Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus [J]. Nat Neurosci, 1999, 2: 266—270.
- [6] Armstrong RJE, Barker RA. Neurodegeneration: a failure of neurogenesis [J]? Lancet, 2001, 358: 1174—1176.
- [7] Song X, Bao M, Li D, et al. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model [J]. Mech Ageing Dev, 1999, 108: 239—251.
- [8] Ho SC, Liu JH, Wu RY. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose [J]. Biogerontology, 2003, 4: 15—18.
- [9] Shang YZ, Gong MY, Zhou XX, et al. Improving effects of SSF on memory deficits and pathological changes of neural and immunological systems in senescent mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22: 1078—1083.
- [10] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry [J]. J Gerontol, 1957, 2: 298—300.
- [11] Ho SC, Liu JH, Wu RY. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose [J]. Biogerontology, 2003, 4: 15—18.
- [12] Zhang YP, Herman B. Ageing and apoptosis [J]. Mech Ageing Dev, 2002, 123: 245—260.
- [13] Limoli CL, Giedzinski E, Rola R, et al. Radiation response of neural precursor cells: linking cellular sensitivity to cell cycle checkpoints, apoptosis and oxidative stress [J]. Radiat Res, 2004, 161: 17—27.