

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.29.002

非肥胖型糖尿病小鼠成年神经发生的实验研究*

党丹 吴芳 郭俊 李宏增 赵聪 汪杰 李川 李柱一[△]

(第四军医大学唐都医院神经内科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨异常免疫反应介导的糖尿病(DM)对大脑神经干/祖细胞(NSC/NPC)增殖的影响。**方法:**依据尿糖测定结果将非肥胖型糖尿病(NOD)小鼠分为发病组和未发病组,观察两组小鼠的体重变化和胰岛炎的严重程度。通过 5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)掺入和免疫荧光染色方法,观察两组小鼠海马齿状回(DG)和侧脑室下区(SVZ)的 BrdU 阳性细胞数量的变化,以评估 NSC/NPC 增殖情况。**结果:**发病组小鼠呈现出多饮、多食、多尿等糖尿病典型症状,体重较未发病组明显减低。发病组小鼠胰腺组织中炎症评分为 3 分的胰岛数量明显多于未发病组,且胰岛炎症的平均评分显著高于未发病组($P<0.05$)。与未发病组比较,发病组小鼠大脑海马 DG 区 BrdU 阳性细胞显著降低($P<0.01$);SVZ 区的 BrdU 阳性细胞数量亦明显少于未发病组($P<0.001$)。**结论:**异常免疫反应介导的 DM 可抑制小鼠大脑 NSC/NPC 的增殖。

关键词:糖尿病;非肥胖型;神经干/祖细胞;增殖

中图分类号:R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)29-5605-04

Study on Adult Neurogenesis in an Animal Model of Non-obese Diabetes*

DANG Dan, WU Fang, GUO Jun, LI Hong-zeng, ZHAO Cong, WANG Jie, LI Chuan, LI Zhu-yi[△]

(1 Department of Neurology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the changes of the proliferation of neural stem/progenitor cell (NSC/NPC) in diabetes mellitus (DM) mediated by abnormal immune responses. **Methods:** Female non-obese diabetic (NOD) mice were divided into non-DM or DM groups according to the results of glycosuria tests. The changes of body weight and the severity of insulinitis were observed and compared between the two groups. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation and subsequent BrdU immunofluorescent staining were used. The NSC/NPC proliferation was assessed by counting the number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus (DG) of hippocampus and in the subventricular zone (SVZ), respectively. **Results:** Diabetic NOD mice exhibited the classical symptoms of hyperglycemia including polydipsia, polyuria, and weight loss. The number of islets with an inflammatory score of 3 was larger in DM group than in non-DM group. The mean inflammatory score of insulinitis is also higher in DM group ($P<0.05$). Compared with non-DM NOD mice, the number of BrdU-positive cells was significantly decreased in the DG of hippocampus in diabetic NOD mice ($P<0.01$). Similarly, a reduced number of BrdU-positive cells also occurred in the SVZ of diabetic NOD mice ($P<0.001$). **Conclusion:** Abnormal immune responses-mediated DM contributes to an impaired NSC/NPC proliferation in female NOD mice.

Key words: Diabetes mellitus; Non-obese; Neural stem/progenitor cell; Proliferation

Chinese Library Classification: R587.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)29-5605-04

前言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种临床上较常见的代谢性疾病,常伴有诸多严重并发症。人体和动物研究均表明,不论哪种亚型的糖尿病,都会导致广泛的大脑功能障碍,如学习和记忆改变^[1]、认知功能受损^[2]、痴呆^[3]等,而成年神经发生(neurogenesis)的改变可能是导致上述功能障碍的结构基础,尤其是在学习和记忆方面。现已证实,成年哺乳动物的大脑中有两个部位拥有不断产生新的神经细胞的能力,分别为海马的齿状回(dentate gyrus, DG)和侧脑室下区(subventricular zone, SVZ)^[4]。迄今糖尿病神经发生的研究更多借助链脲佐菌素(strepto-

zotocin, STZ)诱导的动物模型,但其发病机理并不能较好地模拟人类 1 型糖尿病。因此,本研究借助自身免疫介导的糖尿病动物模型,即非肥胖型糖尿病(non-obese diabetes, NOD)小鼠,通过 5-溴-2'-脱氧尿苷(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)掺入和免疫荧光染色方法,观察 DG 区和 SVZ 区 BrdU 阳性神经干/祖细胞数量的变化,旨在进一步探讨 DM 疾病对成年期神经发生的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

21~22 周龄自发病的以及相同周龄但未发病的雌性

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31200665)

作者简介:党丹(1987-),女,研究生,神经病学, E-mail: dangdan2005@163.com

△ 通讯作者:李柱一,电话:029-84777743, E-mail: lizhuyi@fimmu.edu.cn

(收稿日期:2014-06-05 接受日期:2014-06-28)

NOD 小鼠各 12 只,由第四军医大学神经生物学教研室 SPF 动物室提供。所有小鼠于实验前饲养 1 周以适应新环境,以 3 只/笼饲养,明暗周期设定为 12 h:12 h(07:00-19:00 为灯亮时间),饲养室温度控制在 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。实验期间小鼠可自由进食、饮水。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 BrdU 购自美国 Sigma 公司,大鼠抗 BrdU 抗体购自英国 Abcam 公司,结合德克萨斯红的驴抗大鼠 IgG 购自美国 Jackson ImmunoResearch 公司。胰腺组织 HE 染色所需试剂均购自国内试剂公司。仪器主要包括 Olympus BX-51 型显微镜及 Olympus DP70 图像采集系统(日本)、Leica CM 3050S 型冰冻切片机(德国)。

1.2.2 DM 模型的建立 由于 NOD 小鼠体内存在胰岛 β 细胞特异性免疫细胞,因此持续的自身免疫反应会导致分泌胰岛素的 β 细胞逐渐减少而最终发病。在不同时期至少 3 次检测尿糖呈阳性的 NOD 小鼠,我们诊断为 DM 并纳入发病组。将相同周龄的未发病 NOD 小鼠定义为未发病组。

1.2.3 小鼠体重和病理学检查 实验开始前(即起病当天, D0),对所有 NOD 小鼠进行称重,并在 DM 发病后第 7 天时(D7)再次称重。随后在发病组和未发病组分别随机取 3 只小鼠,用乙醚麻醉动物后开胸,经升主动脉先后灌注 0.9%生理盐水和预冷 4%多聚甲醛溶液,取胰腺组织标本制成冰冻切片,片厚 $10\ \mu\text{m}$,每只小鼠取 18 张切片,相邻切片间隔 $50\ \mu\text{m}$ 。将所取的胰腺组织切片进行 HE 染色后,置于光学显微镜下观察胰岛的炎症浸润情况。具体评分标准如下:胰岛周边单核细胞的浸润范围不足该胰岛面积的 20%者记为 1 分,介于 20%和 50%之间者记为 2 分,大于 50%者记为 3 分;而无任何单核细胞浸润的胰岛记为 0 分。

1.2.4 BrdU 注射方案和免疫荧光染色 在 DM 发病后第 7 天,每组各取 8 只 NOD 小鼠,以 $150\ \text{mg/kg}$ 于腹腔内注射 2 次 BrdU,间隔 2 h。距第 1 次 BrdU 注射 24 h 时处死动物,灌注固定后取脑组织标本制备成冰冻切片,片厚 $30\ \mu\text{m}$ 。海马及侧脑室切片的选取参照我们以往发表的方法^[9]。简而言之,参照 Paxinos & Franklin 小鼠脑图谱,每只小鼠取 7 张海马切片,间隔 $300\ \mu\text{m}$;在前囟 $+0.38\ \text{mm} \sim -0.34\ \text{mm}$ 区间,每只小鼠取 4 张侧脑室切片,间隔 $150\ \mu\text{m}$ 。以大鼠抗 BrdU 抗体(1:600)作为 I 抗,继以结合德克萨斯红的驴抗大鼠 IgG(1:1000)作为 II 抗进行 BrdU 免疫荧光染色。KPBS 洗片后,用防淬灭的封固剂封片,荧光显微镜下观察 BrdU 阳性细胞并计数。按下列公式估算每只小鼠 DG 区或 SVZ 区的 BrdU 阳性细胞总数:Brdu 阳性细胞总数 = 每张切片 BrdU 阳性细胞均数 $\times$ 体积系数(体积系数:DG 区为 10,SVZ 区为 5)。

1.3 统计学处理

胰岛的炎症评分以均数表示,体重以均数 $\pm$ 标准差表示, BrdU 阳性细胞数以均数 $\pm$ 标准误表示,用 SPSS16.0 统计学软件对实验数据进行处理。不同炎症评分的胰岛构成比采用 χ^2 检验,其余数据采用两独立样本 t 检验,取 $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

自发病 NOD 小鼠呈现出了不同程度的饮食增多、尿量增加等 DM 典型症状。此外,发病小鼠还具有毛发蓬松无光泽,精神萎靡,活动减少等表现。我们对发病组和未发病组 NOD 小鼠的体重进行了测量,结果显示,实验开始前(D0)两组小鼠的体重并无明显差异;DM 发病第 7 天后(D7)小鼠的体重显著低于起病当天(D0)(18.29 ± 1.49 vs. 23.01 ± 0.91 , $P < 0.01$),而未发病组小鼠的体重呈现增加的趋势(25.07 ± 1.98 vs. 23.25 ± 0.43 , $P < 0.05$)(图 1)。

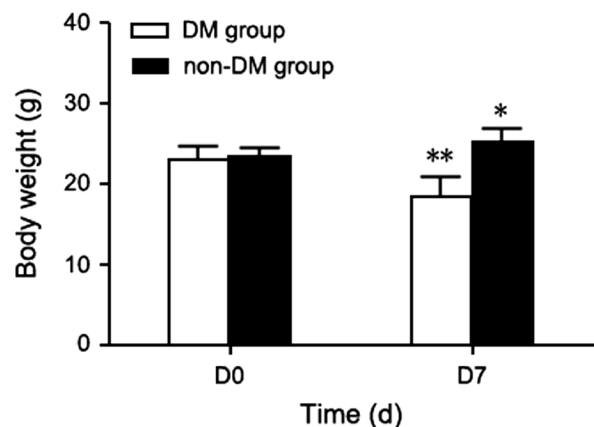


图 1 两组 NOD 小鼠的体重变化

Fig.1 Comparison of weight change NOD mice between two groups

注:与 D0 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$,** $P < 0.01$, compared with D0 group.

2.2 胰岛炎症浸润情况

图 2A-C 分别为胰岛炎症评分 1-3 分的典型病理学表现。我们对每只小鼠的 18 张胰腺组织切片中的所有胰岛炎症情况进行了评分及构成比分析,结果显示,平均有 247 个胰岛/只小鼠接受了评分,发病 NOD 小鼠胰腺组织中的 3 分胰岛数量明显多于未发病组,1 分和 2 分胰岛占有胰岛的百分率两组基本相当,而未发病组的 0 分胰岛数量明显多于发病组(图 2D),两组的构成比具有统计学差异($P < 0.05$)。图 2E 比较了两组小鼠的胰岛炎症平均评分,结果显示发病组小鼠的胰岛炎症平均评分显著高于未发病组($P < 0.05$)。

2.3 BrdU 免疫荧光染色结果

荧光显微镜观察发现,DM 发病 NOD 组、未发病 NOD 组小鼠的海马 DG 区和 SVZ 区均存在 BrdU 阳性细胞,BrdU 为胞核着色,呈椭圆形、圆形或不规则形,成簇或散在分布。与未发病组比较,发病组小鼠大脑海马 DG 区 BrdU 阳性细胞数量显著降低($P < 0.01$);与之相似,发病组小鼠 SVZ 区的 BrdU 阳性细胞数量也明显少于未发病组($P < 0.001$,表 1)。由此表明,自身免疫反应介导的糖尿病损害了小鼠大脑中神经干/祖细胞的增殖。

3 讨论

糖尿病作为一种复杂的代谢综合征,常伴有多系统的严重并发症,其中包括脑组织功能受损^[6]。研究已证实,糖尿病患者的认知功能下降^[7],重度抑郁的发病率升高^[8],罹患痴呆和阿尔

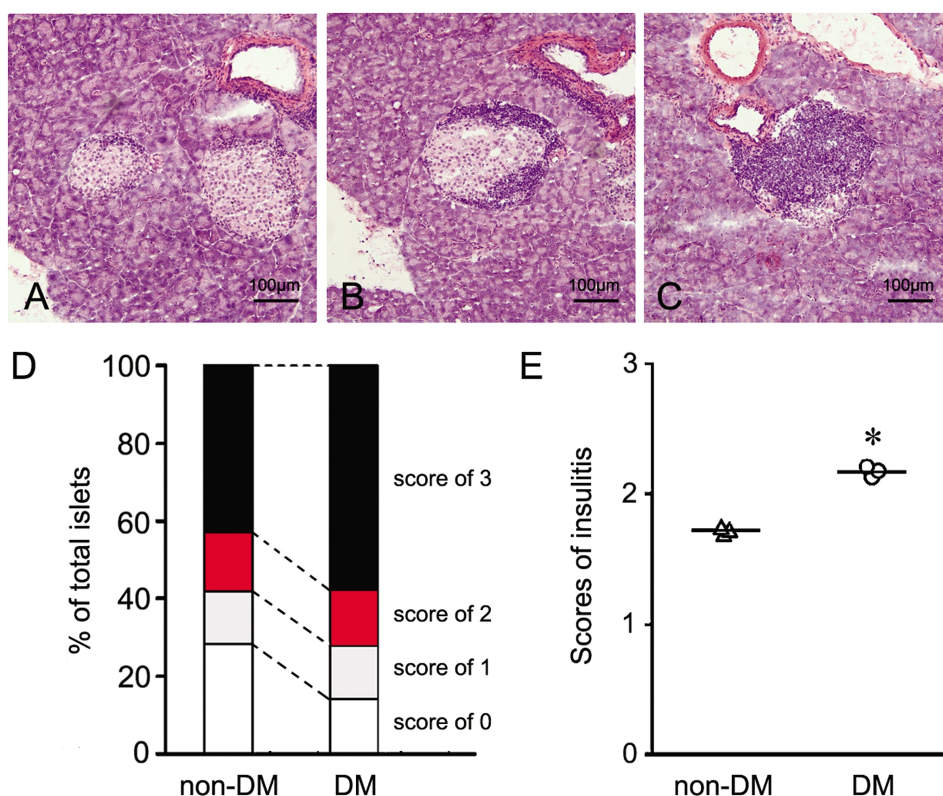


图2 NOD 小鼠胰岛 HE 染色图及炎症评分统计结果

Fig.2 The HE staining of the islet and the results of inflammatory score in NOD mice

注:A-C 分别为胰岛炎症评分 1,2,3 分的 NOD 小鼠胰岛 HE 染色图。* $P < 0.05$,与未发病组比较。Note: A, B, C represents HE staining of 1, 2, 3 scores of insulinitis respectively. * $P < 0.05$, compared with non-DM group.表 1 两组小鼠海马 DG 和 SVZ 区 BrdU 阳性细胞数比较($\bar{x} \pm s$)Table1 Comparison of the number of BrdU-positive cell of two groups of mice in DG and SVZ zone ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	DG zone	SVZ zone
DM	8	256.0 $\pm$ 32.2 **	1845.2 $\pm$ 145.3 ***
NON-DM	8	589.5 $\pm$ 50.6	2784.6 $\pm$ 130.9

注:与未发病组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。Note: compared with non-DM NOD mice,* $P < 0.01$,*** $P < 0.001$.

茨海默病的风险也大大增加^[3]。动物实验针对糖尿病的中枢神经系统损害已进行了广泛研究,包括对成年神经发生的影响。现已明确,哺乳类动物大脑在成年期仍具有产生新的神经细胞的能力^[9],而具有这种能力的仅有两个部位,分别为海马齿状回(DG区)和侧脑室下区(SVZ区)。动物研究显示,1型和2型糖尿病动物的海马DG区的成年期神经发生均显著下降^[10],但是对于糖尿病状态下SVZ区成年神经发生的变化却研究甚少。此外,1型糖尿病动物实验更多采用的是STZ诱导的糖尿病模型,尽管其临床症状可较好地模拟人类1型糖尿病,但其发病机理并不相符。因此,我们借助一种由异常免疫反应介导的自然起病的糖尿病小鼠模型,通过不断破坏产生胰岛素的 β 细胞而致DM发病,最大程度地模拟了人类1型糖尿病的发生。

BrdU是一种胸苷类似物,由于可掺入到S期分裂细胞DNA中而被广泛用于评估细胞的增殖能力。在成年哺乳动物中枢神经系统,目前公认具有分裂增殖能力的只有神经干/祖细胞,因此可通过掺入BrdU而对其增殖进行评估^[9]。本实验

中,我们借助BrdU掺入及染色方法,在自发病的NOD小鼠的大脑海马DG区同样观察到了明显减少的神经干/祖细胞,这与以往的研究结论相一致^[9]。此外,我们在大脑SVZ区也观察到了显著降低的BrdU阳性神经干/祖细胞。

研究表明,下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)轴和糖皮质激素水平可对成年神经发生造成影响。糖尿病控制不佳或不控制的患者的HPA轴活性升高,循环血中糖皮质激素水平升高^[10,11];糖尿病动物研究也观察到了相似结果^[1]。糖皮质激素中的皮质酮是神经发生的重要负性调节因子。在动物实验中,应激诱导的或与年龄相关的皮质酮升高,亦或给予外源性皮质酮可抑制大脑海马DG区以及SVZ区的成年神经发生^[12,13],而肾上腺切除又可促进正常动物大脑相应区域的神经干/祖细胞的增殖^[14]。学者们在STZ诱导的1型糖尿病以及2型糖尿病大鼠的海马区也观察到了类似现象^[1,15]。因此,我们推测本实验中观察到的DM发病NOD小鼠大脑神经干/祖细胞增殖能力的减弱可能是由皮质类固醇激素介导的机制导致的。

NOD 小鼠机体长期处于免疫异常状态。由于体内存在胰岛 β 细胞特异性免疫细胞,因此在 DM 发病前的很长时间内,这些激活的免疫细胞会浸润到胰岛中并持续破坏可产生胰岛素的 β 细胞,从而导致了胰岛炎以及继发的糖尿病。本实验中,我们也在未发病 NOD 小鼠的胰腺组织切片中观察到了大量被炎症细胞浸润的胰岛。研究表明,HPA 轴活性在 NOD 小鼠无 DM 症状的发病前期是升高的^[16,17],这可能与机体长期的免疫异常相关,并对成年神经发生造成了负性影响。DM 发病前的 NOD 小鼠更易患实验性自身免疫性脑脊髓炎,后者是一种中枢神经系统炎性退行性疾病。由此提示上述动物体内的 HPA 轴对应激原的反应可能更为敏感^[18]。此外,血糖代谢异常可能也是调节 NOD 小鼠成年神经再生的关键因素。已有证据显示,糖尿病阶段的血糖高水平会对中枢神经功能造成诸多不良影响^[19]。糖尿病发病前的 NOD 小鼠的基础空腹血糖较低,且伴有短暂性的高胰岛素血症^[20];而低血糖可诱导短暂的海马 DG 区神经发生和继发的神经干 / 祖细胞丢失^[21]。

综上所述,我们在 DM 自发病的 NOD 小鼠大脑海马 DG 区和 SVZ 区观察到了显著降低的神经干 / 祖细胞,而长期的免疫异常状态、HPA 轴活动升高、循环血中皮质类固醇激素水平升高、血糖代谢异常以及可能的脑组织炎症是导致神经干 / 祖细胞增殖能力下降的潜在原因,而具体作用机制有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Stranahan AM, Arumugam TV, Cutler RG, et al. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons[J]. *Nat Neurosci*, 2008, 11(3): 309-317
- [2] Ho N, Sommers MS, Lucik I, et al. Effect of diabetes on hippocampal neurogenesis: link to cognition and depression[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2013, 37(8): 1346-1362
- [3] Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, et al. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function [J]. *Arch Neurol*, 2004, 61(5): 661-666
- [4] Kuwabara T, Kagalwala MN, Onuma Y, et al. Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb[J]. *EMBO Mol Med*, 2011, 3(12): 742-754
- [5] 郭俊, 李宏增, 林宏, 等. 实验性自身免疫性脑脊髓炎对大脑神经干细胞增殖的影响 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2010, 17: 238-241, 246
- [6] Guo Jun, Li Hong-Zeng, Lin Hong, et al. Effect on neural stem cell proliferation in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Chin J Neurol Immunol and Neurol*, 2010, 17: 238-241, 246
- [7] Sima AA. Diabetes underlies common neurological disorders [J]. *Ann Neurol*, 2004, 56(4): 459-461
- [8] Katon W, von Korff M, Ciechanowski P, et al. Behavioral and clinical factors associated with depression among individual with diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(4): 914-920
- [9] Beauquis J, Saravia F, Coulaud J, et al. Prominently decreased hippocampal neurogenesis in a spontaneous model of type 1 diabetes, the nonobese diabetic mouse[J]. *Exp Neurol*, 2008, 210(2): 359-367
- [10] Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation[J]. *Brain Res Rev*, 2007, 53(1): 198-214
- [11] Desrocher M, Rovet J. Neurocognitive correlates of type 1 diabetes mellitus in childhood[J]. *Child Neuropsychol*, 2004, 10(1): 36-52
- [12] Messier C. Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging[J]. *Neurobiol Aging*, 2005, 26(Suppl 1): 26-30
- [13] Lau WM, Qiu G, Helme DM, et al. Corticosteroid decreases subventricular zone cell proliferation, which could be reversed by paroxetine[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2007, 25(1): 17-23
- [14] Yabe T, Hirahara H, Harada N, et al. Ferulic acid induces neural progenitor cell proliferation in vitro and in vivo [J]. *Neuroscience*, 2010, 165(2): 515-524
- [15] Alahmed S, Herbert J. Strain differences in proliferation of progenitor cells in the dentate gyrus of the adult rat and the response to fluoxetine are dependent on corticosterone [J]. *Neuroscience*, 2008, 157(3): 677-682
- [16] McEwen BS, Magariños AM, Reagan LP. Studies of hormone action in the hippocampal formation: possible relevance to depression and diabetes[J]. *J Psychosom Res*, 2002, 53(4): 883-890
- [17] Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, et al. Milestone of neuronal development in the adult hippocampus[J]. *Trends Neurosci*, 2004, 27(8): 447-452
- [18] Saravia FE, Gonzalez S, Roig P, et al. Diabetes increases the expression of hypothalamic neuropeptides in a spontaneous model of type I diabetes, the nonobese diabetic (NOD) mouse [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2001, 21(1): 15-27
- [19] Ichikawa M, Koh CS, Inaba Y, et al. IgG subclass switching is associated with the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide in NOD mice[J]. *Cell Immunol*, 1999, 191(2): 97-104
- [20] Kuwabara T, Asashima M. Regenerative medicine using adult neural stem cells: the potential for diabetes therapy and other pharmaceutical applications[J]. *J Mol Cell Biol*, 2012, 4(3): 133-139
- [21] Homo-Delarche F. Neuroendocrine immuno-ontogeny of the pathogenesis of autoimmune disease in the nonobese diabetic (NOD) mouse[J]. *ILAR J*, 2004, 45(3): 237-258
- [22] Suh SW, Fan Y, Hong SM, et al. Hypoglycemia induces transient neurogenesis and subsequent progenitor cell loss in the rat hippocampus[J]. *Diabetes*, 2005, 54(2): 500-509