

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2018) 05-0413-04

卡介苗对阿尔茨海默病模型小鼠行为和炎症因子的影响

张雨微, 黄 锐, 钱闰唐, 郭娜君, 朱 迪

(皖南医学院 人体解剖学教研室, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 研究卡介苗对阿尔茨海默病(AD) 模型小鼠行为及炎症因子水平的影响。方法: 将 32 只成年 C57BL/6 小鼠随机分成四组, 分别为对照组、AD 组、卡介苗低剂量组(10^4 CFU) 和高剂量组(10^5 CFU) 。除对照组外, 其他三组小鼠均以连续腹腔注射 D-半乳糖建立 AD 模型, 其中两组施以不同剂量的卡介苗。各组小鼠通过旷场和水迷宫检测其活动度和学习记忆功能; 免疫荧光检测脑内 A β 斑块; ELISA 检测血清中炎症因子 TNF- α 和 IFN- γ 的含量。结果: 与对照组相比, AD 小鼠活动度下降, 学习记忆能力退化, 脑内可检测到 A β 沉积, 血清中 TNF- α 、IFN- γ 含量上升, 而经过卡介苗处理的 AD 小鼠, 不论剂量高低, 其行为学均得到改善($P < 0.05$), 脑内 A β 斑块减少($P < 0.05$), 血清中 TNF- α 和 IFN- γ 含量降低($P < 0.05$)。结论: 低剂量和高剂量的卡介苗均能改善 AD 小鼠的行为, 降低小鼠脑内 A β 沉积, 控制血清中的炎症因子。

【关键词】 β -淀粉样肽; 阿尔茨海默病; 卡介苗; 行为学; 炎症因子

【中图分类号】R-332; R 749.16 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.05.002

Impact of Bacillus Calmette-Guérin on the behavior and inflammatory factors in Alzheimer disease mouse model

ZHANG Yuwei, HUANG Rui, QIAN Guantang, GUO Najun, ZHU Di

Department of Anatomy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To observe the impact of Bacillus Calmette-Guérin(BCG) on the behavior and inflammatory factors of model mice with Alzheimer disease(AD). **Methods:** Thirty-two adult C57BL/6 mice were equally divided into control group, AD group, low BCG(10^4 CFU) and high BCG(10^5 CFU) treatment groups. AD mouse models were induced by continuous intraperitoneal injection of D-galactose in three groups except the controls, and different dosage of BCG was applied to two groups of model mice. Then mice in each group were subjected to open-field test and Morris water maze test to observe the activities and the learning and memory abilities. Immunofluorescence stain was used to detect amyloid-beta(A β) -associated cerebral plaques, and ELISA was performed to measure levels of inflammatory factors TNF- α and IFN- γ . **Results:** Compared with the controls, AD mice had decreased activity and ability of learning and memory, and A β deposition could be observed in the brain with increased serum levels of TNF- α and IFN- γ . However, the mice had improved behaviors as well as decreased deposition of A β and TNF- α and IFN- γ levels following treatment with BCG either in low or high dosage(all $P < 0.05$). **Conclusion:** Either low or high dosage of BCG can improve the behaviors in AD mouse, reduce the A β -associated plaques and regulate the serum inflammatory factors.

【Key words】 amyloid-beta; Alzheimer disease; BCG; behaviors; inflammatory factors

阿尔兹海默病(Alzheimer disease, AD) 是中枢神经系统退行性疾病, 主要病理特征是大脑皮层及海马区 β -淀粉样肽(A β) 积累形成老年斑, 伴随缓慢的炎性病理改变^[1]。卡介苗(bacillus calmette-guérin, BCG) 是结核杆菌的减毒活疫苗, 具有非特异性免疫刺激作用, 可诱导机体产生免疫反应, 对机体

具有免疫保护作用。已证实新生期小鼠接种卡介苗可以提高认知功能, 并诱导突触可塑性增强及神经发生增加^[2]。同时, 有文献报道卡介苗在小鼠疾病模型中发挥神经保护性作用, 如神经退行性疾病帕金森综合征等^[3]。我们前期研究发现, AD 模型小鼠注射较高剂量的卡介苗, 可以改善其认知功能, 这

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1608085QH223); 皖南医学院中青年科研基金项目(WK201605)

收稿日期: 2017-11-19

作者简介: 张雨微(1988-), 女, 讲师, (电话) 17730088812, (电子信箱) 504449353@qq.com。

促使我们进一步探究卡介苗对 AD 小鼠炎症水平的改变及接种剂量的影响。本研究拟采用 D-半乳糖腹腔注射建立 C57BL/6 小鼠的 AD 模型,通过高、低剂量的卡介苗给药,探究其对 AD 小鼠行为和脑内 Aβ 的影响,进一步检测炎症因子的变化情况,为卡介苗在 AD 中的应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 12 周龄的 C57BL/6 小鼠 32 只,体质量(18±2) g,动物饲养在皖南医学院实验动物中心。

1.1.2 实验试剂及仪器 D-半乳糖(麦克林);Morris 水迷宫及视频分析系统(众实迪创);TNF-α、IFN-γ 酶联免疫试剂盒(卡尔文);DNM-9602 酶标分析仪;一抗 Aβ42 小鼠(博奥森);二抗小鼠 SABC-FICT(博士德);冰冻切片机(Thermo HM 525NX)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及给药 动物随机分为对照组、AD 模型组、卡介苗低剂量组和高剂量组,每组 8 只。除对照组外,其余各组小鼠均以腹腔注射 D-半乳糖(120 mg/kg),每日 1 次,连续 8 周,对照组腹腔注射等体积生理盐水(NS)。卡介苗分别以低剂量(10⁴CFU)和高剂量(10⁵CFU)在实验开始的 0 周、4 周和 8 周通过皮内注射给药。

1.2.2 旷场实验(Open-field test) 旷场为 60 cm×60 cm×45 cm 的空旷封闭箱子,底部以标记线分为 6 小格×6 小格,顶部中央安置摄像机,记录小鼠在旷场中的自发行为,每只小鼠记录 30 min。

1.2.3 Morris 水迷宫实验(Morris-water Maze) Morris 水迷宫训练小鼠在一个直径为 80 cm 的水池

内寻找到水下的隐藏平台。实验共 4 d,小鼠分别从四个象限面朝池壁放入水池,60 s 内找到平台的时间记录为逃避潜伏期,反映小鼠的学习记忆功能^[4]。

1.2.4 ELISA 检测血清中炎症因子水平 摘眼球取血并分离血清,检测小鼠 TNF-α 和 IFN-γ 含量。试剂盒加样 200 μL/孔,37℃ 水浴 2 h,加入羊抗小鼠 IgG HRP,37℃ 水浴 1 h,加入 TMB 显色液,避光 15 min 显色后加终止液,30 min 内用酶联免疫检测仪 490 nm 波长记录读数。

1.2.5 免疫荧光染色 生理盐水灌注后的小鼠取脑浸泡在 4% 的多聚甲醛溶液中充分固定后,依次浸泡于 10%、20%、30% 的蔗糖溶液平衡,用冰冻切片机制成 40 μm 的漂片,用含 0.25% Triton X-100 的 1% BSA 在 37℃ 水浴封闭 30 min,抗 Aβ42 小鼠(1:400)孵育 2 h 后 4℃ 过夜,第二天取出加入羊抗小鼠 555(1:400)37℃ 水浴 2 h,漂洗后将脑片裱于防脱载玻片上,并用甘油/PBS(1:1)封片,激光共聚焦扫描显微镜拍照^[5]。

1.2.6 统计学分析 用 SPSS 18.0 统计软件的单因素方差进行分析处理,结果表示为 $\bar{x} \pm s$, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠在旷场中的自主活动度 与 NS 对照组相比,AD 小鼠在中央区域的活动性降低,直立次数低于对照组,粪粒数增多($P < 0.05$),表明小鼠的自主活动和探索能力下降、焦虑水平提升。而卡介苗处理后的小鼠活动性提高($P < 0.05$),高低剂量间差异无统计学意义(表 1)。表明卡介苗能够提高 AD 小鼠的活动度、缓解焦虑。

表 1 卡介苗对小鼠旷场自主活动的影响

组别	穿中央格次数	中央格时间/s	直立次数	粪粒数
NS 对照组	39.75±8.29	16.82±4.15	50.38±14.44	4.25±1.04
AD 组	26.25±6.76*	11.23±2.42*	30.75±8.58*	6.13±1.36*
BCG 低剂量组	38.00±6.97 [#]	16.07±3.19 [#]	48.25±13.27 [#]	4.88±1.73
BCG 高剂量组	39.38±7.03 [#]	16.32±3.24 [#]	48.63±12.99 [#]	4.38±1.06 [#]
F	6.248	4.967	4.331	3.343
P	0.002	0.007	0.013	0.033

注:与 NS 对照组相比,* $P < 0.05$;与 AD 组相比,[#] $P < 0.05$ 。

2.2 小鼠在水迷宫中的学习记忆功能 各组小鼠逃避潜伏期逐渐缩短。第 3、4 天,AD 小鼠的逃避潜伏期长于对照组($P < 0.05$),而经卡介苗处理的 AD

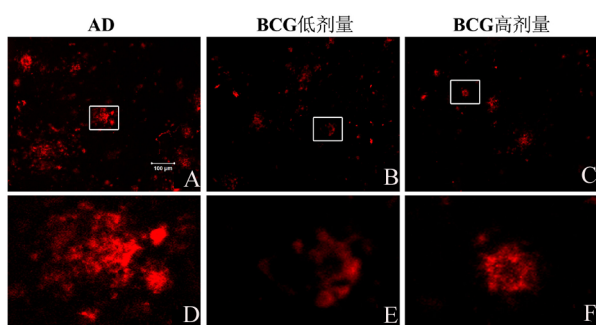
小鼠逃避潜伏期缩短($P < 0.05$)(表 2),高低剂量之间差异无统计学意义。提示卡介苗可改善 AD 小鼠的学习记忆功能。

表 2 小鼠定位航行的逃避潜伏期

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
NS 对照组	43.86±8.46	34.40±11.98	20.65±7.96	16.51±5.69
AD 组	47.68±7.68	40.45±13.31	35.17±12.80*	31.58±14.54*
BCG 低剂量组	46.21±8.66	36.62±11.50	23.88±7.31#	19.73±5.64#
BCG 高剂量组	45.87±6.88	35.81±11.13	22.25±6.36#	19.32±4.75#
F	0.313	0.372	4.325	4.796
P	0.816	0.774	0.013	0.008

注:与 NS 对照组相比,* P<0.05;与 AD 组相比 #P<0.05。

2.3 AD 小鼠脑内的 Aβ 沉积 免疫荧光检测各组小鼠脑内 Aβ 沉积 结果显示(图 1) D-半乳糖造模的 AD 小鼠脑内可检测到 Aβ 斑块,而经卡介苗处理后,小鼠脑内的 Aβ 斑块面积减少。表明卡介苗缓解了 AD 模型小鼠脑内的 Aβ 沉积。



A~C 分别为 AD 组、BCG 低剂量组和 BCG 高剂量组小鼠脑内的 Aβ 斑块染色;D~F 分别为 A~C 图方框内的放大图像。

图 1 小鼠脑内 Aβ 斑块的检测

2.4 小鼠血清中炎症因子的含量 ELISA 检测小鼠血清中 TNF-α 和 IFN-γ 的含量 结果显示(表 3),AD 模型小鼠血清中的炎症因子 TNF-α 和 IFN-γ 高于 NS 对照组(P<0.05),而卡介苗的处理抑制了外周炎症因子的表达,表现为 TNF-α 和 IFN-γ 的含量下降(P<0.05)。高低剂量之间差异无统计学意义。

表 3 各组小鼠血清中炎症细胞因子的含量 ng/L

组别	TNF-α	IFN-γ
NS 对照组	34.50±12.02	60.39±14.99
AD 组	56.93±12.11*	84.07±12.68*
BCG 低剂量组	38.25±11.47#	65.99±13.25#
BCG 高剂量组	37.73±13.93#	61.76±8.98#
F	5.383	5.970
P	0.005	0.003

注:与 NS 对照组相比,* P<0.05;与 AD 组相比 #P<0.05。

3 讨论

AD 是以认知能力减退为主要特征的老年性痴

呆,其病程与 Aβ 密切相关,同时炎症细胞因子发生变化,非炎性神经斑块发展为炎性神经斑块^[6]。D-半乳糖诱导 AD 模型是通过引起氧化应激反应,使脑神经元发生退行性变化,出现 AD 特征^[7]。研究表明,卡介苗可以调节机体细胞免疫,影响炎症因子等,而新生小鼠接种卡介苗可以促进其中枢神经发生并增强突触可塑性^[2]。我们前期研究证实了 AD 小鼠接种卡介苗后认知功能得到改善,在本研究中,我们进一步探索不同剂量的卡介苗对 AD 小鼠行为和脑内 Aβ 沉积的影响,并进一步检测小鼠血清中两种主要的促炎因子 TNF-α 和 IFN-γ。

结果显示卡介苗处理的 AD 小鼠行为得到改善,脑内 Aβ 斑块减少,炎症因子水平下降,提示卡介苗改善 AD 小鼠的病理变化可能是通过抑制 AD 小鼠的炎症因子,减轻蛋白的神经毒性来实现的。而高剂量和低剂量卡介苗处理的小鼠各指标统计无差异。在行为学实验中,小鼠进入旷场箱,对新环境产生恐惧;另一方面又喜欢探究,使其在中央区域活动并直立察看^[8]。Morris 水迷宫反映了空间学习记忆相关的脑区功能,通过逃避潜伏期来评价 AD 的行为学指标。在本研究中,卡介苗处理的 AD 小鼠表现出较强的活动度和学习记忆功能,缓解痴呆症状。

目前普遍认为 Aβ 是 AD 的发病原因,AD 患者脑内可检测到 Aβ 斑块^[9],经卡介苗处理后则减少,缓解了 AD 的病理变化。研究发现,AD 患者脑内能检测到大量炎症免疫因子,使斑块发展为炎性神经斑块,加重神经损伤^[10]。临床发现 AD 患者血液中 TNF-α 和 IFN-γ 升高^[11],因此本实验检测了小鼠血清中这两种因子,发现 AD 小鼠血清中炎症因子水平高于对照组,而经卡介苗处理后含量下降。表明卡介苗降低了 AD 小鼠血清中的炎症水平。

在一系列指标的检测中,我们发现低剂量和高剂量卡介苗的处理对 AD 小鼠行为、斑块及炎症因子的改善作用并无统计学差异。这是因为影响免疫

(下转第 419 页)

- older adults with mild cognitive impairment: study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials* 2015 ,16: 232.
- [2] MENG L ,QIAN S. Gastrodin protects neural progenitor cells against amyloid β (1-42) -induced neurotoxicity and improves hippocampal neurogenesis in Amyloid β (1-42) -injected mice [J]. *J Mol Neurosci* 2016 ,60: 21-32.
- [3] 姚婕,张红梅,阎丽萍,等. BDNF 调控 SIRT1/PGC-1 α 通路拮抗 A β 25~35 诱导的神经元细胞氧化损伤[J]. *中国医药导报*, 2016 ,13(20) : 16-21.
- [4] SELKOE D ,MANDELKOW E ,HOLTZMAN D. Deciphering Alzheimer disease[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med* ,2012 ,2(1) : a11460.
- [5] SHENG B ,GONG K ,NIU Y *et al.* Inhibition of gamma-secretase activity reduces Abeta production ,reduces oxidative stress ,increases mitochondrial activity and leads to reduced vulnerability to apoptosis: Implications for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Free Radic Biol Med* 2009 ,46(10) : 1362-1375.
- [6] PRAKASH A ,KUMAR A. Role of nuclear receptor on regulation of BDNF and neuroinflammation in hippocampus of β -amyloid animal model of Alzheimer's disease [J]. *Neurotox Res* 2014 ,25(4) : 335-347.
- [7] MORRIS KC ,LIN HW ,THOMPSON JW *et al.* Pathways for ischemic cytoprotection: Role of sirtuins in caloric restriction ,resveratrol ,and ischemic preconditioning [J]. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011 ,31(4) : 1003-1019.
- [8] WANG J ,HO L ,ZHAO W *et al.* Grape-derived polyphenolics prevent Abeta oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci* ,2008 ,28(25) : 6388-6392.
- [9] 王康锋,张立娟,陈新勇.电针大椎及百会穴治疗老年性痴呆 36 例临床观察[J]. *中华中医药杂志* 2015 ,30(3) : 784-786.
- [10] 董卫国,林岚,王丰,等.电针对快速老化小鼠海马线粒体呼吸链功能的影响[J]. *中国针灸* 2012 ,32(8) : 726-730.
- [11] 孙国杰,罗磊,杜艳军,等.针灸对 AD 模型大鼠海马神经元线粒体保护机制研究[J]. *中国针灸* 2014 ,34(2) : 157-162.
- [12] 黄新格,零佩东,赵利华.D-半乳糖 AD 模型与中医脑衰老证候病机关系的探讨及在针灸防治脑衰老中的应用[J]. *世界中医药* 2015 ,10(12) : 1983-1986.
- [13] 周楠楠,朱燃,赵雪梅,等.天麻素抑制小鼠大脑内 A β 斑块形成及其作用机制[J]. *药学学报* 2016 ,51(4) : 588-594.
- [14] 高健美,陆国辉,李艳茹,等.天麻素通过 SIRT1/PGC-1 α 信号通路抗叔丁基过氧化氢诱导的 HL7702 细胞氧化损伤[J]. *中药药理与临床* 2014 ,30(4) : 32-35.
- [15] 王耀帅,张建斌,王玲玲,等.对针药结合研究现状与发展趋势的思考[J]. *中医杂志* 2012 ,53(6) : 473-475.

(上接第 415 页)

效果的因素很多,包括外部环境因素、疫苗使用因素等,其中免疫程序、免疫途径、免疫剂量等均有影响。一般研究表明^[12],初次免疫通常产生的效应较低,而多次重复后可有效激活细胞免疫,增强机体反应性。同时有研究显示低剂量卡介苗可对机体产生较好的免疫保护作用。因此,在本研究中,低剂量的卡介苗即可有效刺激机体免疫系统,而经过重复接种,再次的免疫应答被有效激活,产生级联反应,与高剂量免疫间的差异无统计学意义。

综上所述,卡介苗能下调 AD 小鼠血清中的炎症因子水平,减轻 A β 神经毒性,改善 AD 小鼠的行为活动,可在 AD 治疗中发挥作用。

【参考文献】

- [1] IAA MEBANE-SIMS. 2016 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement* 2016 ,12(4) : 459-509.
- [2] YANG J ,FANGFANG Q ,ZHIBIN Y *et al.* Neonatal BCG vaccination of mice improves neurogenesis and behavior in early life [J]. *Brain Research Bulletin* 2015(120) : 25-33.
- [3] DYE C. Making wider use of the world's most widely used vaccine: Bacille Calmette-Guerin revaccination reconsidered [J]. *J R Soc Interface* 2013 ,10(87) : 365.
- [4] VORHEES CV ,WILLIAMS MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. *Nature Protocols* 2006 ,1: 848-858.
- [5] ZHANG Y ,ZOU J ,YANG J *et al.* 4Abeta1-15-derived monoclonal antibody reduces more abeta burdens and neuroinflammation than homologous vaccine in APP/PS1 mice [J]. *Curr Alzheimer Res* , 2015 ,12(4) : 384-397.
- [6] SELKOE DJ. Alzheimer's disease: genes ,proteins ,and therapy [J]. *Physiol Rev* 2001 ,81(2) : 741-766.
- [7] CUI X ,ZUO P ,ZHANG O *et al.* Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss ,neurodegeneration ,and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid [J]. *Neurosci Res* 2006 ,84: 647-654.
- [8] 刘友平,刘田,毕航,等.品系、性别和生物节律对小鼠旷场实验的影响[J]. *西安交通大学学报(医学版)* ,2014 ,35(5) : 634-638.
- [9] PAN X ,GONG N ,ZHAO J ,*et al.* Powerful beneficial effects of benfotiamine on cognitive impairment and beta-amyloid deposition in amyloid precursor protein/presenilin-1 transgenic mice [J]. *Brain* 2010 ,133: 1342-1351.
- [10] WILCOCK DM ,JANTZEN PT ,LI Q *et al.* Amyloid-beta vaccination ,but not nitro-nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment , increases vascular amyloid and microhemorrhage while both reduce parenchymal amyloid [J]. *Neuroscience* 2007 ,144: 950-960.
- [11] 雷洪涛,王筠,马淑骅,等. IL-1 β 、TNF- α 与阿尔茨海默病的研究进展[J]. *中国老年学杂志* 2014 ,34(24) : 7115-7117.
- [12] 吉海杰,王黎明,李会,等.细胞因子诱导的杀伤细胞免疫治疗肿瘤研究进展[J]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)* ,2012 ,2(4) : 295-301.