

白细胞介素-10对冈田酸诱导的阿尔茨海默病模型大鼠的保护作用

李冰,毛丰,方小霞,邱一华*

(南通大学医学院生理学系,江苏 南通 226001)

[摘要] 目的:观察细胞因子白细胞介素-10(IL-10)预处理对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型鼠行为学和分子生化改变的保护作用,并探讨其机制。方法:SD大鼠海马微量注射冈田酸(okadaic acid, OA)及IL-10建立AD模型。用水迷宫检测大鼠逃避潜伏期;用Western blot方法检测海马匀浆中蛋白磷酸酯酶2A (protein phosphatase 2A, PP2A)和淀粉样蛋白前体(amyloid precursor protein, APP)的表达量;用流式细胞术检测肠系膜淋巴结中的CD4⁺细胞数与CD8⁺细胞数的比值。结果:大鼠海马注射OA后,动物的水迷宫逃避潜伏期时间增加,且高浓度OA组水迷宫逃避潜伏期时间均长于低浓度OA组;海马内PP2A蛋白的表达下调,且随着OA浓度的加大,对PP2A蛋白表达的抑制作用加强,APP蛋白的表达增强,且随着OA浓度的加大,对APP蛋白表达的增强作用更明显。IL-10与OA注射入大鼠海马后,动物的水迷宫逃避潜伏期时间明显少于仅注射OA的AD模型动物;IL-10能够逆转OA引起的PP2A蛋白表达减少,对抗OA引起的APP蛋白表达增加;IL-10可使OA诱导的CD4⁺/CD8⁺增加翻转到对照水平。结论:大鼠海马多次微量注射OA可诱导大鼠产生AD样病变,即可诱导AD模型,IL-10可以抑制OA诱导的大鼠产生AD样病变,IL-10的这种作用与它抑制炎症反应有关。

[关键词] 阿尔茨海默病;冈田酸;蛋白磷酸酯酶2A;淀粉样蛋白前体;白细胞介素-10;CD4⁺/CD8⁺

[中图分类号] R749.16

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)07-932-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130716

Interleukin-10 prevents rats from okadaic acid-induced Alzheimer's disease

Li Bing, Mao Feng, Fang Xiaoxia, Qiu Yihua*

(Department of Physiology, School of Medicine, Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effects of interleukin-10 (IL-10) pretreatment on the behavioral and molecular biochemical changes of Alzheimer's disease (AD) rat models and its possible mechanism. **Methods:** Okadaic acid (OA) was microinjected into the hippocampus of rats to establish the AD rat models. The escape latency of rats was tested by water maze. Western-blot method was used to detect the expression of protein phosphatase 2A (PP2A) and amyloid precursor protein (APP) in the hippocampus. Simultaneously, the ratio of CD4⁺ cells to the CD8⁺ cells in the mesenteric lymph node cells was examined by flowcytometry. **Results:** The latent period in water maze of rats that were injected with OA in the hippocampus was significantly increased, and the latent period of the rats with high concentration of OA injection was longer than that of the rats with low concentration of OA injection. The PP2A protein expression in hippocampus after the OA injection was down-regulated, and the inhibitory effect of OA on PP2A protein expression was enhanced as the OA concentrations increased. Conversely, APP protein expression in hippocampus was increased with the elevated concentrations of OA injected in the hippocampus. After IL-10 and OA were injected into the rat hippocampus respectively, the latent period of water maze was significantly lower than that of the AD rats only with the OA injection. IL-10 reversed the inhibitory effect of OA on PP2A expression and alleviated the augment of APP; furthermore, IL-10 reversed the increasing of CD4⁺/CD8⁺ induced by OA and caused the CD4⁺/CD8⁺ return to the control level. **Conclusion:** AD-like changes can be induced by the microinjection of OA into the hippocampus. IL-10 can reverse the AD-like changes induced by OA, and the effects of IL-10 are dose-dependent and also closely related to its inhibition of inflammatory reaction.

[Key words] Alzheimer's disease; okadaic acid; protein phosphatase 2A; amyloid precursor protein; interleukin-10; CD4⁺/CD8⁺

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7):932-936]

[基金项目] 江苏省自然科学基金项目(BK2011386);南通大学自然科学基金(11Z003, 12Z003)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yhqiu@ntu.edu.cn

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种中枢神经系统退行性疾病,临床主要表现为进行性的记忆减退、认知障碍和行为损害^[1]。AD 的病因和发病机制尚未完全阐明。在中枢神经系统退行性疾病过程中常伴随炎症反应,小胶质细胞释放细胞因子、促炎细胞因子水平不断升高。白细胞介素(IL)-1、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ 干扰素(IFN- γ)这些促炎细胞因子都被证明对神经元有损伤作用,AD 患者的老年斑中这些促炎因子水平明显升高^[2-5]。IL-10 是一种抗炎因子,它可以抑制促炎因子的释放^[6]。国外研究发现,IL-4、IL-10、IL-13 可以抑制 β -淀粉样蛋白 1-42(β -amyloid peptide, A β 1-42)诱导的 AD 模型动物的大脑小胶质细胞释放促炎因子和趋化因子^[7];而抑制内源性 IL-10 活性,可导致脂多糖诱导的 AD 模型动物的神经元进一步损伤,促炎细胞因子普遍升高^[8]。但是外源性 IL-10 是否能缓解 AD 的行为学和分子生化改变的进程,国内外未见相关研究报道。在本研究中,主要在整体条件下,研究 IL-10 预处理对 AD 模型动物的行为学和分子生化改变是否具有缓解作用,并探讨其可能机制,可望为 AD 的发病机制和防治措施提供新的研究思路。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 大鼠雌雄不限,体重 200~250 g,由南通大学实验动物中心提供,自由饮食,室温 22~25℃,每日光照 12 h。

冈田酸(okadaic acid, OA, 德国 Biomol 公司); FITC anti-rat CD8b, PE anti-rat CD4 (美国 BioLegend 公司);兔抗 PP2A 抗体(美国 Cell Signal 公司);兔抗 APP 抗体(美国 Upstate 公司);鼠抗人 β -actin 单克隆抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG、HRP 标记山羊抗鼠 IgG(美国 Sigma 公司);IL-10(美国 Protech 公司)。

动物立体定位仪(902-A 型, KOPF 公司, 美国);生物显微镜(DML 型, Leica 公司, 德国);自动磨刀仪(SP 9000 型, Leica 公司, 德国);台式冷冻离心机(Beckman 21R 型, Beckman 公司, 美国);显微镜(YS 100 型, Nikon 公司, 日本);Odyssey 双红外激光扫描仪(9120 型, LI-COR 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组和 AD 样模型制备

实验随机分成以下几组:正常组、DMSO 对照组、OA 组和 IL-10 预处理组,每组 8 只。正常组不做任何

处理, DMSO 对照组在海马内注射 10%DMSO 0.5 μ l, OA 组分别在海马注射溶于 10%DMSO 的 OA (0.2、0.4、0.8 mmol/L) 各 0.5 μ l, 以 0.1 μ l/min 的速度缓慢注射, 留针 10 min, 然后徐徐启针; IL-10 预处理组在海马注射溶于 5 mmol/L Tris(pH 7.2) 的 IL-10 (0.2 mg/ml) 0.5 μ l, 1 h 后再在同一部位注射 0.4 mmol/L 的 OA 0.5 μ l, 上述组注射均每 2 d 注射 1 次, 连续 3 次, 术后均予青霉素抗感染。

1.2.2 Morris 水迷宫行为学检测

Morris 水迷宫系统, 直径 120 cm, 高 60 cm, 室温及水温均保持在(22 \pm 2)℃。大鼠入水后游泳时限为 2 min。连续 6 d 记录各组大鼠的逃避潜伏期, 120 s 为最长逃避潜伏期, 药物注射后的第 2 天再次行水迷宫实验, 记录大鼠的逃避潜伏期。实验重复 8 次。

1.2.3 Western blot 法检测大鼠海马 PP2A 和 APP 表达水平

大鼠进行完水迷宫实验后, 断头取脑, 在冰盒上切取海马组织, 放入 EP 管, 加入一定比例组织裂解液进行组织匀浆, 匀浆后将组织裂解物煮沸 10 min, 离心 12 000 r/min, 4℃, 10 min, 吸取上清于一新的 Ep 管中, -70℃保存备用。行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析, 以 β -actin 作为内参。实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞仪检测肠系膜淋巴细胞中的 CD4⁺ 细胞数与 CD8⁺ 细胞数的比值

制备肠系膜淋巴细胞悬液, 调整细胞浓度为 2×10^7 个/ml。在双阴管中加 50 μ l 染色液, 在单标管中加 40 μ l 染色液, 在双标管中加 30 μ l 染色液, 然后在各管中加 50 μ l 细胞悬液, 在单标管中加 10 μ l PE anti-rat CD4 或 10 μ l FITC anti-rat CD8b, 在双标管中加 10 μ l PE anti-rat CD4 和 10 μ l FITC anti-rat CD8b。混匀各管细胞, 置于 4℃ 闭光孵育 20 min, 加染色液 1 ml, 洗细胞 2 次(1 500 g, 3 min, 4℃), 将细胞重悬于 500 μ l 染色液中, 充分混匀, 将样品放置于冰浴上待测。使用 BD FACSCalibur 流式细胞仪配置的 CellQuest 软件系统进行检测分析, 计算出肠系膜淋巴细胞中的 CD4⁺ 细胞数与 CD8⁺ 细胞数的比值。

1.3 统计学方法

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件中的单因素方差分析和 SNK-*q* 检验进行数据的处理和比较, 以 $P \leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

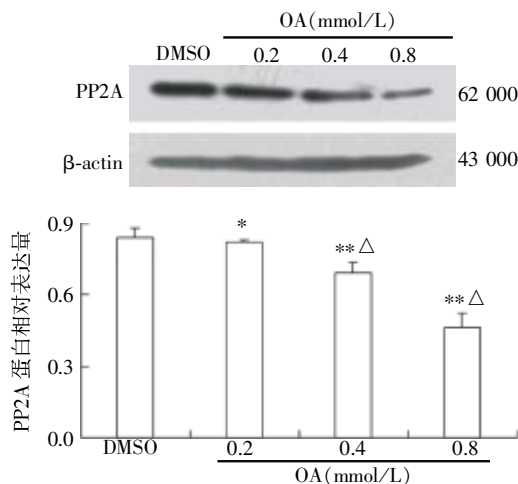
2.1 大鼠海马注射 OA 后动物水迷宫逃避潜伏期

的变化

在 OA 微量多次注射入大鼠海马后,对动物进行水迷宫检测。结果发现,动物的水迷宫逃避潜伏期时间均明显高于大鼠海马注射 DMSO 的对照组以及未经任何处理的空白对照组;在不同浓度 OA 之间,注射高浓度 OA 的动物水迷宫逃避潜伏期时间均长于低浓度 OA 组(图 1)。说明大鼠海马注射 OA 可导致动物学习记忆功能的减退,且 OA 的这种作用具有浓度依赖性。

2.2 大鼠海马注射 OA 后海马内 PP2A 和 APP 蛋白表达的变化

在 OA 微量多次注射入大鼠海马后,海马内 PP2A 蛋白的表达均低于海马注射 DMSO 的对照组,并且随着 OA 浓度的加大,对 PP2A 蛋白表达的抑制作用加强,各浓度组间的差异具有显著统计学



与 DMSO 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 OA(0.2 mmol/L)组比较, [△] $P < 0.05$ 。

图 2 海马内注射 OA 对 PP2A 和 APP 蛋白表达的影响

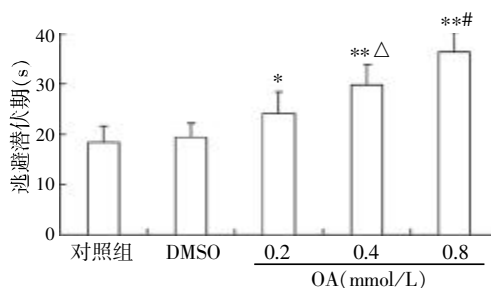
Figure 2 The PP2A and APP protein expression after the OA injection

2.3 海马注射 IL-10 降低 AD 动物的水迷宫逃避潜伏期时间

IL-10 (0.2 mg/ml, 0.5 μ l) 与 OA (0.4 mmol/L, 0.5 μ l) 多次注射入大鼠海马内,发现动物的水迷宫逃避潜伏期时间明显低于 OA 组的 AD 动物,但仍高于海马注射 DMSO 的对照组(图 3),说明 IL-10 可以减轻 OA 导致的 AD 动物学习记忆功能减退。

2.4 海马注射 IL-10 逆转 AD 动物的 PP2A 蛋白表达减少并抑制 APP 蛋白表达

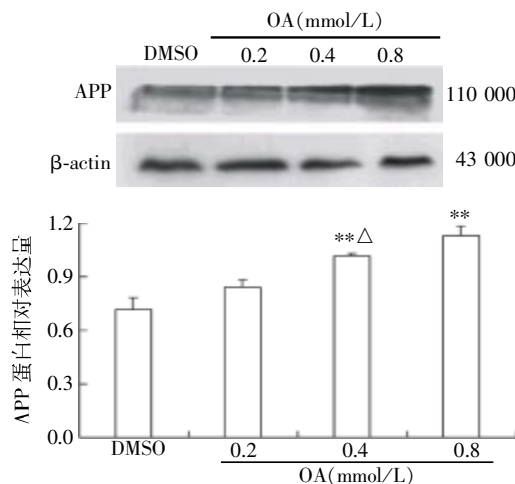
IL-10(0.2 mg/ml, 0.5 μ l) 分别与 OA(0.4 mmol/L, 0.5 μ l) 多次注射入大鼠海马内,动物的 PP2A 蛋白表达显著高于 OA 组, APP 蛋白表达低于 OA 组(图 4)。说明 IL-10 预处理能够改善 OA 所致的 PP2A 蛋白表达减少,并能够对抗 OA 引起的 APP 蛋白表达



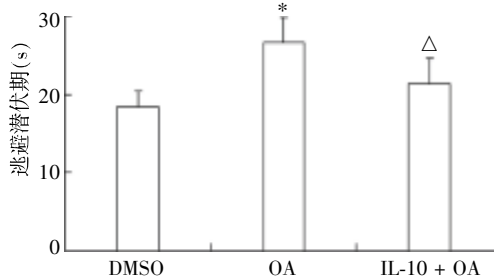
与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 OA (0.2 mmol/L) 组比较, [△] $P < 0.05$; 与 OA(0.4 mmol/L)组比较, [#] $P < 0.05$ 。

图 1 大鼠海马注射 OA 后动物水迷宫逃避潜伏期的变化
Figure 1 The latent period in water maze of rats after injected with OA

意义(图 2)。APP 蛋白的表达均高于海马注射 DMSO 的对照组,并且随着 OA 浓度的加大,对 APP 蛋白表达的增强作用更明显,各浓度组间的差异具有统计学意义(图 2)。



增加的作用(图 4)。



与 DMSO 组比较, * $P < 0.01$; 与 OA 组比较, [△] $P < 0.01$ 。

图 3 IL-10 预处理大鼠海马注射 OA 后动物水迷宫逃避潜伏期的变化

Figure 3 The latent period in water maze of IL-10 treatment rats

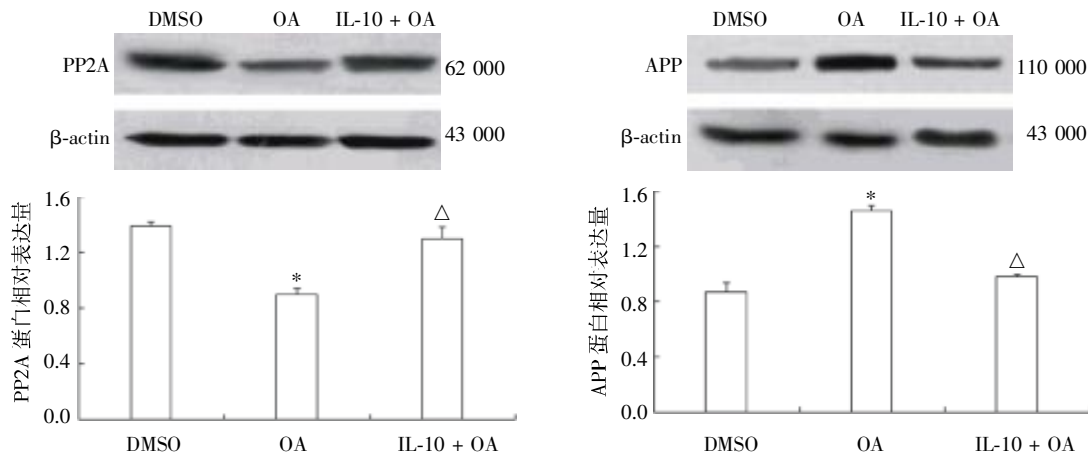
2.5 海马注射 IL-10 对 OA 诱导的 CD4⁺/CD8⁺增加的影响

海马注射 OA(0.4 mmol/L,0.5 μl)后,肠系膜淋巴结细胞中的 CD4⁺细胞数与 CD8⁺细胞数的比值(CD4⁺/CD8⁺)明显增加(图 5)。IL-10(0.2 mg/ml,0.5 μl)分别与 OA(0.4 mmol/L,0.5 μl)多次注入

大鼠海马内,CD4⁺/CD8⁺回降,与单独注射 OA 相比明显降低($P < 0.01$),与海马注射 DMSO 对照组比较,无显著差异(图 5)。

3 讨论

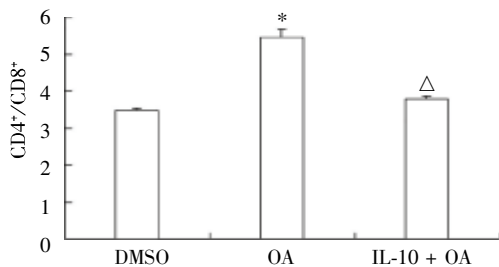
OA 酸是一种海洋生物的提取物,可抑制蛋白



与 DMSO 组比较, * $P < 0.01$; 与 OA 组比较, $^{\Delta}P < 0.01$ 。

图 4 IL-10 预处理大鼠海马内注射 OA 对 PP2A 和 APP 蛋白表达的影响

Figure 4 The PP2A and APP protein expression of IL-10 treatment rats



与 DMSO 组比较, * $P < 0.01$; 与 OA 组比较, $^{\Delta}P < 0.01$ 。

图 5 IL-10 预防 OA 诱导的大鼠淋巴结 CD4⁺/CD8⁺增加

Figure 5 IL-10 reversed the CD4⁺/CD8⁺ increase induced by OA

磷酸酯酶 PP1 和 PP2A 活性使 Tau 蛋白磷酸化^[9]。Tau 蛋白是一种小分子量的微管相关蛋白,AD 患者脑内 Tau 蛋白处于高度磷酸化状态^[10]。Tau 蛋白的磷酸化受蛋白激酶和蛋白磷酸酶调节,其中最主要的是蛋白磷酸酯酶 PP2A^[11]和蛋白激酶 GSK-3 β ^[12]。正常个体中,蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶的作用处于动态平衡中,但 AD 患者脑中 PP2A 的活性比正常同龄人明显下降,神经元 Tau 蛋白出现过度磷酸化,由此聚集成双螺旋丝,并进一步形成神经原纤维缠结^[13]。APP 是一种跨膜糖蛋白,在 β 和 γ 分泌酶作用下,可分别在细胞膜外或跨膜部分将 APP 水解成一完整长度的可溶性 A β ,溶解状 APP 通过 G 蛋白

干预细胞内信号过程,增加微管相关蛋白激酶的活性。研究发现 AD 患者的脑中 APP 水平明显高于正常同龄人^[14]。本实验着重检测 OA 作用后大鼠的行为学改变及大鼠海马 PP2A 和 APP 表达水平变化,结果发现注射 OA 的动物的水迷宫逃避潜伏期时间均明显高于未注射 OA 的对照组;在不同浓度 OA 之间,注射高浓度 OA 的动物水迷宫逃避潜伏期时间均长于低浓度 OA 组。说明大鼠海马注射 OA 可导致动物学习记忆功能的减退,且 OA 的这种作用具有浓度依赖性,这与国内外的文献报导一致^[16-17]。OA 注射后 PP2A 受到明显抑制,而 APP 表达明显增加,二者都有明显的浓度依赖性。由此提示,本实验使用 OA 诱导的 AD 动物模型是可靠和有效的。

对于 AD 病程的持续进展,目前仍然缺乏有效的控制方法。寻找理想的治疗药物和手段,是当前神经科学领域的难点和热点。有学者认为 AD 病涉及一个炎症反应过程,头部损伤、感染等炎症条件是 AD 发病的潜在的危险因素,用非甾体类抗炎药能延续和防止 AD 的发作。IL-10 是一种抗炎因子,可以抑制炎症发生以及促炎细胞因子的释放。研究发现 IL-4、IL-10、IL-13 可以抑制 A β 1-42 诱导的 AD 模型动物的大脑小胶质细胞释放促炎因子和趋化因

子^[7,15],但是外源性 IL-10 是否能缓解 AD 的行为学和分子生化改变的进程,国内外未见相关研究报道。通过预实验及文献^[18],研究 IL-10 预处理后,对 AD 模型动物的行为学和分子生化改变是否有缓解作用。结果发现动物的水迷宫逃避潜伏期时间明显低于仅注射 OA 的 AD 动物,说明 IL-10 可以减轻 OA 导致的 AD 动物学习记忆功能减退,但不能完全逆转 OA 的作用。IL-10 能够改善 OA 所致的 PP2A 蛋白表达减少,同时拮抗 OA 诱导的 APP 蛋白表达增加。肠系膜淋巴结中存在 4 种肠系膜淋巴细胞亚群,即 CD4⁻CD8⁻双阴性淋巴细胞、CD4⁺CD8⁺双阳性淋巴细胞、CD4⁺CD8⁻单阳性淋巴细胞和 CD4⁻CD8⁺单阳性淋巴细胞。CD4⁺总淋巴细胞数与 CD8⁺总淋巴细胞数的比值反映了体内的炎症反应程度。本研究用流式细胞仪来检测肠系膜淋巴细胞各亚群占总肠系膜淋巴细胞的百分比,计算出 CD4⁺与 CD8⁺淋巴细胞的比值。结果发现海马注射 OA 后,肠系膜淋巴细胞中 CD4⁺/CD8⁺明显增加。IL-10 与 OA 多次注射入大鼠海马内 CD4⁺/CD8⁺回降,与单独注射 OA 相比明显降低,与 DMSO 对照组比较无显著差异,结果说明,IL-10 可减轻 OA 导致的 CD4⁺/CD8⁺的增加。提示 AD 会产生炎症反应,而 IL-10 是抗炎因子,必然抑制其炎症效应,本实验已证实 IL-10 可以缓解 OA 诱导的 AD 模型大鼠的行为学和分子生化改变,这与 IL-10 减轻 OA 导致的 CD4⁺/CD8⁺增加的变化趋势是一致的,所以本文认为是因为抑制了炎症反应才缓解了大鼠的 AD 样变化,也间接证明了抗炎治疗的可行性。但是 AD 产生炎症反应的具体机制,以及炎症反应在 AD 发生发展过程中的具体作用还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Malenka RC, Malinow R. Alzheimer's disease; Recollection of lost memories [J]. *Nature*, 2011, 469 (7328): 44-45
- [2] Wyss-Coray T. Inflammation in Alzheimer disease; driving force, bystander or beneficial response? [J]. *Nat Med*, 2006, 12(9): 1005-1015
- [3] Tobinick E. Perispinal etanercept for neuroinflammatory disorders [J]. *Drug Discov*, 2009, 14(3-4): 168-177
- [4] Margittai M, Langen R. Side Chain-dependent stacking modulates Tau filament structure [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(49): 37820-37827
- [5] Ongali B, Nicolakakis N. Transgenic mice overexpressing APP and transforming growth factor-beta1 feature cognitive and vascular hallmarks of Alzheimer's disease [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(6): 3071-3080
- [6] Weisman D, Hakimian E, Ho GJ. Interleukins, inflammation, and mechanisms of Alzheimer's disease [J]. *Vitam Horm*, 2006, 74: 505-530
- [7] Azizi G, Mirshafiey A. The potential role of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2012, 34(6): 881-895
- [8] Park KW, Lee HG, Jin BK, et al. Interleukin-10 endogenously expressed in microglia prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat cerebral cortex in vivo [J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(6): 812-819
- [9] Chen XC, Fang F, Zhu YG, et al. Protective effect of ginsenoside Rg1 on MPP⁺-induced apoptosis in SHSY5Y cells [J]. *J Neural Transm*, 2003, 110(8): 835-845
- [10] Mandelkow EM, Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(7): a006247
- [11] Watkins GR, Wang N, Mazalouskas MD, et al. Monoubiquitination promotes calpain cleavage of the protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunit $\alpha 4$, altering PP2A stability and microtubule-associated protein phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(29): 24207-24215
- [12] Lee J, Hong H, Im J, et al. The formation of PHF-1 and SMI-31 positive dystrophic neurites in rat hippocampus following acute injection of okadaic acid [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 282(1-2): 49-52
- [13] Goedert M, Jakes R, Qi Z, et al. Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates Tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase [J]. *J Neurochem*, 1995, 65(6): 2804-2807
- [14] Govaerts L, Schoenen J, Bouhy D. Pathogenesis of Alzheimer's disease. molecular and cellular mechanisms [J]. *Rev Med Liege*, 2007, 62(4): 209-216
- [15] Benveniste EN, Nguyen VT, O'Keefe GM. Immunological aspects of microglia; relevance to Alzheimer's disease [J]. *Neurochem Int*, 2001, 39(5-6): 381-391
- [16] Kamat PK, Tota S, Rai S, et al. Okadaic acid induced neurotoxicity leads to central cholinergic dysfunction in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 690(1-3): 90-98
- [17] 吕心瑞, 潘 娅, 李清春. 冈田酸对大鼠学习记忆功能及脑内 ChAT 和 GFAP 表达的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2006, 22(4): 399-403
- [18] Keceli M, Kucuk C, Sozuer E, et al. The effect of interleukin-10 on acute pancreatitis induced by cerulein in a rat experimental model [J]. *J Invest Surg*, 2005, 18(1): 7-12

[收稿日期] 2013-02-03